

**Studien zur Rolle des *LATERAL SUPPRESSOR*-Gens
bei der Initiation von Achselmeristemen:
Analyse von Doppelmutanten und Charakterisierung
von Modifikatoren des *las-4*-Phänotyps**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

Vorgelegt von
Oliver Clarenz
aus Leverkusen

Köln 2004

Gutachter: 1. Prof. Dr. Klaus Theres
2. Prof. Dr. Wolfgang Werr
mündliche Prüfung: 07.07.2004

1	Einleitung	6
1.1	Meristeme organisieren das postembryonale Wachstum von Pflanzen	6
1.2	<i>KNOX</i> -Gene verhindern eine Differenzierung der meristematischen Zellen.....	6
1.3	Organisation des Sprossmeristems	7
1.4	Die Identität des Sprossmeristems wechselt bei der Blühinduktion	8
1.5	Musterbildung im Blütenmeristem: Das ABC-Modell der Blütenentwicklung.....	9
1.6	Lateralmeristeme	11
1.7	Mutanten mit verändertem Verzweigungsmuster	11
1.8	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Enzyme	16
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.4	Organismen	17
2.1.5	Oligonukleotide	18
2.1.6	Computerprogramme und Datenbanken	21
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Genetische Kartierung.....	21
2.2.2	Isolierung von DNA	21
2.2.3	Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	21
2.2.4	Wachstumsbedingungen für Pflanzen	22
2.2.5	Kreuzungen von Pflanzen	22
2.2.6	Sequenzierungen	23
2.2.7	Elektronenmikroskopie	23
2.3	Verwendete Abkürzungen.....	23
3	Ergebnisse	26
3.1	Genetische Analyse der Funktion von <i>LAS</i> durch Doppelmutantenanalysen	26
3.1.1	Allgemeine Vorbemerkungen zur Doppelmutantenanalyse	26
3.1.2	Charakterisierung von <i>las-4/axr1-12</i> -Doppelmutanten	27
3.1.3	Charakterisierung von <i>las-4/ max1-1</i> -Doppelmutanten	33
3.1.4	Charakterisierung von <i>las-4/max2-1</i> -Doppelmutanten	35
3.1.5	Charakterisierung von <i>las-4/rev-5</i> -Doppelmutanten.....	38
3.1.6	Charakterisierung von <i>stm-2/las-4</i> -Doppelmutanten	41

3.1.7	Charakterisierung von <i>wus-1/las-4</i> -Doppelmutanten.....	45
3.1.8	Charakterisierung von <i>clv3-2/las-4</i> -Doppelmutanten	48
3.1.9	Charakterisierung von <i>lfy-14/las-4</i> -Doppelmutanten.....	50
3.1.10	Charakterisierung von <i>apl-10/las-4</i> -Doppelmutanten.....	54
3.1.11	Charakterisierung von <i>ag-1/las-4</i> -Doppelmutanten.....	58
3.2	EMS-Mutagenese von <i>las</i> -Mutanten.....	61
3.2.1	Allgemeine Vorbemerkungen	61
3.2.2	Durchführung der Mutagenese.....	62
3.2.3	Screening der M ₂ -Generation.....	63
3.2.4	Charakterisierung der 4 Kandidaten.....	66
3.2.5	Allelie-Test.....	75
3.2.6	<i>las-4</i> im Landsberg <i>erecta</i> -Hintergrund.....	77
3.2.7	<i>ag-1/las-4</i> -Kreuzung	79
3.2.8	Kartierung von <i>eol3</i>	81
4	Diskussion	88
4.1	Analyse der Doppelmutanten.....	88
4.1.1	<i>LAS</i> und <i>REV</i> wirken im gleichen Entwicklungsweg	88
4.1.2	Bei der Bildung von Seitentrieben aus der Rosette wird die Funktion von <i>LAS</i> früher benötigt als die von Genen, die das Auswachsen der Knospen regulieren	89
4.1.3	Die postembryonale Organogenese ist in <i>stm-2/las-4</i> - und <i>wus-1/las-4</i> -Doppelmutanten nicht unterdrückt.....	93
4.1.4	<i>clv3-2/las-4</i> -Pflanzen zeigen keine synergistischen Effekte.....	94
4.1.5	Die geänderte Meristem-Identität von <i>lfy-14</i> -Mutanten verstärkt den <i>las-4</i> -Phänotyp.....	95
4.1.6	Charakterisierung von <i>apl-10/las-4</i> -Doppelmutanten.....	96
4.1.7	<i>ag-1/las-4</i> -Doppelmutanten	98
4.2.	<i>enhancer/suppressor</i> -screen.....	98
4.1.8	<i>eol1</i> , <i>eol3</i> , <i>eol5</i> und <i>eol6</i> verstärken den Verzweigungsphänotyp von <i>las-4</i> unter Kurztagbedingungen	98
4.1.9	Wachstumsbedingungen und der genetische Hintergrund beeinflussen das Verzweigungsmuster von <i>las-4</i> -Mutanten	100
4.1.10	Die <i>eol3</i> -Mutation befindet sich auf Chromosom 1 und ist mit <i>las-4</i> gekoppelt	

5	Zusammenfassung.....	102
6	Abstract.....	104
7	Literaturverzeichnis.....	106
8	Erklärung.....	113
9	Lebenslauf.....	114

1 Einleitung

1.1 Meristeme organisieren das postembryonale Wachstum von Pflanzen

Die embryonale Entwicklung von Pflanzen und Tieren unterscheidet sich in einem zentralen Punkt. Tiere zeigen nach Abschluss der Embryogenese bereits im Wesentlichen den gleichen Körperplan wie im adulten Stadium. Dagegen werden bei höheren Pflanzen während der Embryogenese nur die Keimblätter, das Hypocotyl, das Sprossapikalmeristem (SAM) sowie das Wurzelmeristem (*root apical meristem*, RAM) angelegt. Die Meristeme bilden während der postembryonalen Entwicklung die Wachstumspole. Sie produzieren über die gesamte Lebenszeit der Pflanze fortwährend laterale Organe. Das primäre SAM, das während der Embryogenese an der Basis der Kotyledonen angelegt wird, produziert in der vegetativen Wachstumsphase Blätter. In den Achseln der Blätter werden Lateralmeristeme angelegt, die in gleicher Weise funktionieren wie das primäre SAM und für die Produktion der Seitensprosse verantwortlich. Die Architektur zeigt einen modularen Aufbau (Steeves und Sussex, 1989; Sussex und Kerk, 2001). Phytomere oder Metamere, bestehend aus Blatt, der Achselknospe und dem Abschnitt des Sprosses zwischen zwei Blättern, dem Internodium (Lyndon, 1990), wiederholen sich fortlaufend. Im Laufe der Entwicklung einer Pflanze kann sich auch die Identität eines Meristems ändern. Nach der Blühinduktion, dem Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase, produziert das SAM Blüten.

1.2 *KNOX*-Gene verhindern eine Differenzierung der meristematischen Zellen

Die Etablierung des SAM findet während der Embryogenese statt. Eine entscheidende Rolle fällt dabei dem Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren zu. Ein größeres Verständnis dieser Vorgänge bei der Etablierung des SAM brachte die Analyse von Mutanten, die während der Embryogenese kein funktionierendes Meristem an der Basis der Kotyledonen etablieren. Dies ist zum Beispiel in homozygoten *shoot meristemless (stm)*-Mutanten der Fall (Barton und Poethig, 1993; Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996). Starke Allele von *stm*

(*stm-1*) können kein Meristem an der Basis der Kotyledonen etablieren, schwache Allele wie *stm-2* legen Meristeme an, die aber nur kurzzeitig aktiv sind. Das *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*)-Gen kodiert einen Homöodomänen-Transkriptionsfaktor vom *KNOX*-Typ (*knotted1-like homeobox-containing*). *STM* spielt eine entscheidende Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung des Meristems. Die Expression von *STM* wird während der Embryogenese initiiert und bleibt während der postembryonalen Entwicklung im SAM erhalten. *STM* wird im Meristem und in interprimordialem Gewebe transkribiert, nicht aber in Organprimordien. Durch seine negative Regulationswirkung auf die Biosynthese des Phytohormons Gibberellinsäure (GA) erhält *STM* das meristematische Potenzial der Zellen aufrecht (Hay et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass *NTH15*, ein *KNOX*-Gen aus Tabak, direkt an regulatorische Elemente der GA20-Oxidase *Ntc 12* bindet und deren Transkription unterdrückt (Sakamoto et al., 2001). GA20-Oxidasen katalysieren den entscheidenden Schritt, der GA in die biologisch aktive Form überführt. GA wiederum wirkt positiv auf die Differenzierung von Zellen. Die Tatsache, dass die Applikation von exogenem GA den mutanten Phänotyp einer *KNOX*-Gen Misexpression unterdrückt, ist ein weiterer Hinweis, dass *STM* einen negativen Einfluss auf die GA Biosynthese ausübt und somit auf die Zelldifferenzierung (Hay et al., 2002). Außerdem führt eine Mutation im *SPINDLY*-Gen, die sich in einer konstitutiven Aktivierung der GA-Signaltransduktion auswirkt, zu einer Verstärkung des *stm-2*-Phänotyps (Hay et al., 2002).

In Blattprimordien werden die *KNOX*-Gene *KNAT1* und *KNAT2*, nicht aber *STM* durch das Myb-Gen *ASYMMETRIC LEAVES1* reprimiert (Byrne et al., 2000; Ori et al., 2000). Andererseits wird *ASI* im Meristem durch *STM* reprimiert.

Diese Beobachtungen weisen auf einen komplexen Mechanismus hin, über den das meristematische Potenzial der Zellen des SAM erhalten wird.

1.3 Organisation des Sprossmeristems

Eine weitere Mutante, die während der Embryogenese kein normales SAM anlegt, ist *wuschel* (Laux et al., 1996). Das *WUSCHEL*- (*WUS*) Gen kodiert ebenfalls einen Homöodomänen-Transkriptionsfaktor. *WUS*-Expression wird bereits im 16-Zell-Stadium während der Embryogenese aktiviert (Mayer et al., 1998) und wird im späteren SAM in wenigen Zellen der L3-Schicht exprimiert. Der Phänotyp der *wus-1*-Mutante kommt durch einen Verlust des primären SAM und die späte Bildung von Adventiv-Meristemen zustande, die nach der

Anlage weniger Blattprimordien das Wachstum wieder einstellen. Anschließend bilden sich weitere Meristeme, die wiederum nur kurzzeitig aktiv sind (Laux et al., 1996). Die Ursache dafür liegt in einem Verlust der Stammzellpopulation während des Wachstums. Es konnte gezeigt werden, dass die Etablierung der Meristeme in *wus-1/rev-6*-Mutanten teilweise unterdrückt wird (Otsuga et al., 2001). Da *REVOLUTA* (*REV*) für die Bildung von Achselmeristemen nötig ist (Talbert et al., 1995), deutet dies darauf hin, dass die neu gebildeten Adventiv-Meristeme in *wus-1* den Charakter von Achselmeristemen haben.

Histologisch kann ein Meristem aufgrund der Zellteilungsaktivität in 3 Zonen aufgeteilt werden. In der zentralen Zone befinden die sich langsam, aber kontinuierlich teilenden Stammzellen. Die Größe der Stammzellpopulation ist stabil, weil die Teilungsrate der Stammzellen und die Anzahl der Zellen, die in die periphere Zone abgegeben werden, genau koordiniert werden. In der peripheren Zone herrscht eine höhere Teilungsrate, hier werden die Organ-Primordien gebildet. In der Rippenzone bildet sich das innere Sprossgewebe.

Die Funktion von *WUS* liegt in der Regulation der Größe der Stammzellpopulation in der Mitte des Meristems. Dies geschieht in Abhängigkeit von den *CLAVATA1*- (*CLV1*), *CLAVATA2*- (*CLV2*) und *CLAVATA3*- (*CLV3*) Loci. Im Gegensatz zu *wus-1* Mutanten besitzen *clv1/2/3*-Mutanten eine vergrößerte Stammzellpopulation. Während *WUS* das Stammzellschicksal positiv beeinflusst, wirken *CLV1/2/3* negativ (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000).

Die LRR-Rezeptorkinase *CLV1* (Clark et al., 1993) und das Rezeptorprotein *CLV2* (Jeong et al., 1999) bilden einen Rezeptorkomplex, der in der L3 lokalisiert ist. Das Rezeptormolekül *CLV3* wird von Stammzellen sekretiert (Fletcher et al., 1999; Rojo et al., 2002) und reprimiert über den *CLV1/CLV2* Rezeptorkomplex und eine unbekannte Signalkaskade die *WUS*-Expression. Durch diese negative Rückkopplung entsteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Förderung und Repression des Stammzellschicksals. Dadurch wird eine gleichbleibende Anzahl von Stammzellen in der zentralen Zone gewährleistet.

1.4 Die Identität des Sprossmeristems wechselt bei der Blühinduktion

Wie eingangs erwähnt ändert sich im Laufe der postembryonalen Entwicklung die Identität des SAM. Nach der Blühinduktion bildet das Meristem Blüten anstatt Blätter, also reproduktive Organe.

Die Bildung reproduktiver Organe ist essentiell zur Erhaltung der Art. Deshalb verwundert es nicht, dass der Prozess der Blühinduktion redundant reguliert ist. Neben dem tageslängenabhängigen Entwicklungsweg gibt es noch vernalisations- und hormonabhängige Stoffwechselwege sowie einen autonomen Entwicklungsweg (Übersichtsartikel: Putterill et al., 2004). Durch Komponenten dieser Blühinduktions-Mechanismen werden Meristemidentitätsgene aktiviert, die wiederum durch Aktivierung von Organ-Identitätsgenen den Charakter eines Organs festlegen.

In *leafy*-Mutanten kann der Übergang vom vegetativen zum Infloreszenzmeristem nicht vollständig vollzogen werden (Weigel et al., 1992). Nach der Blühinduktion bilden sich anstelle von Blüten Blätter und verlängerte Internodien. Werden die Pflanzen bei konstantem Licht angezogen, werden zunächst weiter Blätter gebildet, in deren Achseln Seitentriebe mit vegetativem Charakter gebildet werden. Später werden blütenähnliche Organe gebildet, die im Gegensatz zum Wildtyp ein Tragblatt besitzen (Liljegren et al., 1999). Die Organe dieser Blüten sind spiralförmig anstatt in Wirteln angelegt (Weigel et al., 1992). Außerdem bilden die lateralen Organe lediglich Sepalen und Karpelle. Unter Kurztagbedingungen (8h Licht, 16h Dunkelheit) zeigen *lfy*-Mutanten einen stärkeren Phänotyp. Sie bilden nach der Blühinduktion weiterhin Blätter, die Seitentriebe und keine blütenähnlichen Organe anlegen (Liljegren et al., 1999). *LFY* aktiviert Blütenorgan-Identitäts-Gene, unter anderem auch *APETALA1* (*API*) (Parcy et al., 1998). *API* hat einerseits eine Funktion als Blütenorgan-Identitäts-Gen im ersten und zweiten Wirtel, aber auch eine Funktion als Meristem-Identitäts-Gen. Dies wird bei der Charakterisierung der *ap1*-Mutante deutlich. So bilden sich vor allem an den Blütenstielen der ersten Blüten neben der eigentlichen Blüte noch ektopische Blüten. Sie entstehen teilweise am Blütenstiel, in den meisten Fällen aber in den Achseln der Sepalen. Je später die Blüten in der Entwicklung entstehen, desto schwächer ist dieser Phänotyp ausgeprägt. Bei *ap1*- Mutanten haben florale Meristeme teilweise den Charakter von Infloreszenz-Meristemen. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass *API* die Identität von floralen Meristemen fördert.

1.5 Musterbildung im Blütenmeristem: Das ABC-Modell der Blütenentwicklung

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Defekten fehlen bei *ap1*-Mutanten noch die Petalen. Das liegt daran, dass *API* ebenfalls eine Funktion als Organ-Identitätsgen hat.

Wie in Abbildung 1.1. A und B gezeigt, sind die Blütenorgane einer *Arabidopsis*-Blüte in konzentrischen Wirteln organisiert. Im äußersten (1.) Wirtel werden 4 Kelchblätter (Sepalen) gebildet, im zweiten 4 Blütenblätter (Petalen), im dritten 6 Staubblätter (Stamen) und im vierten, innersten 2 Fruchtblätter (Karpelle).

In *Arabidopsis* und *Antirrhinum* wurden eine Vielzahl Mutanten entdeckt, die homöotische Transformationen der Organ-Identitäten bestimmter Blütenwirtel zeigten. In diesen ist die Identität zweier nebeneinanderliegender Wirtel durch die Identität anderer Wirtel ersetzt. So ist beispielsweise in einer *apetala3*-Mutante die B-Funktion ausgefallen. Die Blüten der Mutanten bilden im zweiten Wirtel Sepalen anstatt Petalen und im dritten Wirtel Karpelle anstatt Stamen (Bowman et al., 1989). Durch systematische Charakterisierung der Mutanten wurde das ABC-Modell der Blütenentwicklung etabliert (Coen und Meyerowitz, 1991).

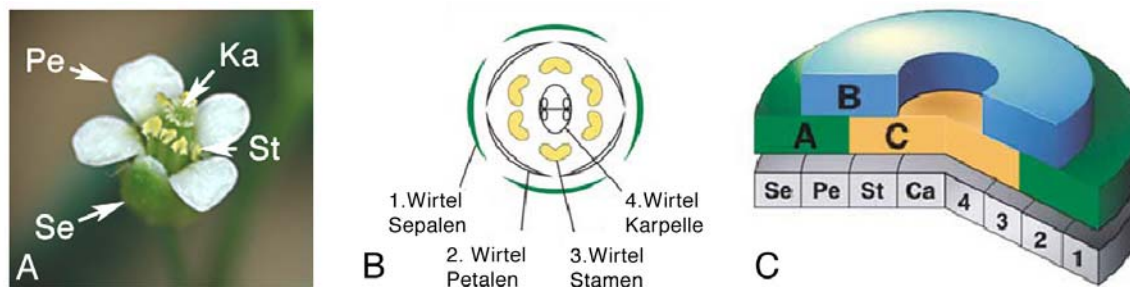


Abb. 1.1: Organidentität in der Arabidopsis-Blüte. A: reife Arabidopsis-Blüte mit Sepalen (Se), Petalen (Pe), Stamen (St) und Karpellen (Ka). B: Blütendiagramm mit Angabe der Wirtel. C: Schematische Darstellung der A-, B- und C-Funktionsdomänen. Abbildung modifiziert nach Lohmann und Weigel, 2002.

Das ABC-Modell beruht darauf, dass die Identität der vier Organtypen durch teilweise überlappende Expressionsdomänen dreier Genfunktionen, der A-, B- und C-Funktion aktiviert wird. Wie in Abbildung 1.1.C gezeigt, ist die A-Funktion im ersten und zweiten Wirtel aktiv, die B-Funktion im zweiten und dritten Wirtel und die C-Funktion im dritten und vierten Wirtel. Demnach werden Sepalen in dem Wirtel gebildet, in der nur die A-Funktion aktiviert ist, Petalen in dem Wirtel mit A- und B-Funktion, Stamen bei Aktivierung von B und C-Funktion und Karpelle werden in der C-Funktionsdomäne gebildet. Außerdem reprimieren sich A und C-Funktion gegenseitig. Molekular sind die drei Funktionen mit Ausnahme von APETALA2 (AP2) von MADS-Box-Transkriptionsfaktoren repräsentiert. Das Mads-Box Protein AGAMOUS (AG) wirkt in Blüten als C-Funktion und wird im dritten und vierten Wirtel exprimiert. In *ag-1*-Mutanten werden im dritten Wirtel Petalen gebildet und im vierten Wirtel Sepalen. Ein weiterer Defekt deckt eine zusätzliche Funktion von AG bei der Termination des floralen Meristems auf. Blüten von *ag-1*-Mutanten terminieren nicht und

legen immer wieder neue Wirtel Sepalen und Petalen an. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *LEAFY* (*LFY*), *WUS* und *AG* gemeinsam für die Termination des Meristems notwendig sind. Dabei aktivieren *LFY* und *WUS* gemeinsam *AG*, welches dann die Termination des Meristems bewirkt (Lohmann et al., 2001; Lenhard et al., 2001).

1.6 Lateralmeristeme

Während der vegetativen Phase produziert das SAM fortwährend Blätter. In den Achseln der Blätter entwickeln sich die Lateralmeristeme. Diese Meristeme gleichen in ihrer Organisation und Funktionsweise dem primären SAM. Nicht vollkommen geklärt ist die Frage der Entstehung dieser Meristeme. Zwei Modelle, die die Herkunft der meristematischen Zellen erklären, werden diskutiert. Zum einen könnten bereits differenzierte Zellen wieder zu pluripotenten meristematischen Zellen umprogrammiert werden (*de novo meristem initiation*), zum anderen könnten während der vegetativen Wachstumsphase Zellen in den Blattachseln deponiert werden, in denen das meristematische Potenzial erhalten bleibt (*detached meristem*, Steeves and Sussex, 1989). Obwohl verschiedene Aspekte auf eine Entstehung der Lateralmeristeme nach der *detached meristem*-Modell hinweisen, konnte dies noch nicht eindeutig belegt werden. Der bisher beste Hinweis auf die Richtigkeit der *detached* Hypothese ist die Expression des *LATERAL SUPPRESSOR*-(*LAS*) Gens. *LAS*, das als Marker für Lateralmeristeme dient, zeigt im SAM Coexpression mit dem Meristem-Marker *STM*. *LAS*-Expression ist bereits an der adaxialen Basis des P₁-Primordiums etabliert und bleibt bis zum P20/22-Primordium erhalten (Greb et al., 2003).

Bei der Entwicklung von Lateralmeristemen müssen Initiation und Auswachsen voneinander unterschieden werden. Die Initiation von Achselmeristemen findet während der vegetativen Phase in einem acropetalen Gradienten statt (Hempel und Feldmann, 1994; Grbic und Bleeker, 1996; Stirnberg et al., 1999, 2002). Nach der Blühinduktion werden Lateralmeristeme entweder gleichmässig (Stirnberg et al., 1999, 2002) oder in einem basipetalen Gradienten (Grbic und Bleeker, 1996; Hempel und Feldmann, 1994) angelegt. In der reproduktiven Phase erfolgt das Auswachsen der Triebe einem basipetalen Gradienten (Hempel und Feldmann, 1994; Grbic und Bleeker, 1996; Stirnberg et al., 1999, 2002).

1.7 Mutanten mit verändertem Verzweigungsmuster

Es konnten unterschiedliche Gruppen von Mutanten isoliert werden, die gegenüber Wildtyp-Pflanzen ein verändertes Verzweigungsmuster aufweisen.

Eine Gruppe von Mutanten zeigte eine stärkere Verzweigung gegenüber dem Wildtyp und hat ein buschiges Erscheinungsbild.

Die *auxin resistant 1-12-(axr1-12)* Mutante zeichnet sich durch ein verstärktes Auswachsen von Seitentrieben aus. *AXR1* reprimiert also das Auswachsen der Achselknospen (Lincoln et al., 1990; Stirnberg et al., 1999). *AXR1* kodiert für eine Untereinheit eines heterodimeren RUB-aktivierenden Enzyms (del Pozo et al., 1998). Bei RUB handelt es sich um ein Ubiquitinähnliches Molekül. Die Modifikation von Proteinen geschieht über einen Ubiquitinähnlichen Mechanismus. Durch RUB-Konjugation wird vermutlich die zelluläre Lokalisation von Proteinen beeinflusst (Lammer et al., 1998; Morimoto et al., 2000). *axr1-12*-Mutanten sind insensitiv gegenüber exogener Auxin-Applikation (Lincoln et al., 1990). Dies deutet darauf hin, dass Auxin einen entscheidenden regulatorischen Einfluss beim Auswachsen der Achselknospen ausübt (Stirnberg et al., 1999).

In einem weiteren *Screen* für Mutanten mit verändertem Verzweigungsmuster wurden die *more axillary growth-(max)* Mutanten identifiziert. Bei *MAX1* und *MAX2* handelt es sich um zwei Loci, die das Auswachsen von Achselknospen unterdrücken. Sowohl *max1-1* als *max2-1* zeigen ein verstärktes Auswachsen der Triebe aus der Rosette. Die Analyse der *max1-1/max2-1* Doppelmutante zeigte, dass beide Gene im gleichen Entwicklungsweg wirken. Während das *MAX1*-Gen noch nicht isoliert wurde, konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei *MAX2* um ein Protein der F-Box-Familie handelt (Stirnberg et al., 2002). *MAX2* wurde zuvor schon von anderen Forschern als *ORE9* und möglicher Regulator von Blattseneszenz identifiziert (Woo et al., 2001).

Das *SUPERSHOOT/BUSHY-(SPS/BUS)* Gen kodiert für ein Cytochrom P450-Protein (Tantikanjana et al., 2001; Reintanz et al., 2001). Im Unterschied zu *axr1-12* und den *max*-Mutanten bilden *sps/bus* Mutanten in jeder Blattachsel eine Vielzahl Meristeme. In *sps/bus*-Mutanten konnten erhöhte Cytokininwerte nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung des Phytohormons Cytokinin bei der Anlage der Meristeme hinweist (Tantikanjana et al., 2001).

Eine zweite Gruppe von Mutanten zeigt eine teilweise Unterdrückung der Anlage von Achselmeristemen. In *revoluta- (rev)* Mutanten ist die Anlage von Seitentrieben in allen Blattachsen unterdrückt (Talbert et al., 1995). *REVOLUTA (REV)* gehört zur Klasse HD-ZIP-Gen-Familie. Es wird in Achselmeristemen und in provasculärem Gewebe exprimiert. *REV* ist identisch mit dem *INTERFASCICULAR FIBRELESS-(IFL)* Gen. Zhong und Zheng-Hua (2001) beschreiben einen Zusammenhang zwischen einem reduzierten Auxintransport in *ifl*-

Mutanten und der Unterdrückung der Seitentriebbildung und Defekten während der Blütenbildung, was wieder auf eine Rolle von Auxin hinweist.

Eine weitere Mutante mit einem starken Phänotyp ist *carpel factory (caf)* (Jacobsen et al., 1999). *CAF* kodiert für ein RNase III Enzym, das an der Prozessierung von microRNAs beteiligt ist (Jacobsen et al., 1999, Park et al., 2002). *caf*-Mutanten bilden keine Seitentriebe aus Blättern. Darüber hinaus haben sie eine veränderte Blattform, blühen spät und produzieren zusätzliche Wirtel Stamen und Karpelle (Jacobsen et al., 1999). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass *REV* ebenso wie andere Mitglieder der Klasse III HD-ZIP-Gene durch microRNAs reguliert werden (Emery et al., 2003). Außerdem konnte dies für Mitglieder der GRAS-Genfamilie nachgewiesen werden (Rhoades et al., 2002; Llave et al., 2002).

Außerdem zeigt die *pinhead/zwille-(pnh/zll)* Mutante eine Unterdrückung von Seitentrieben (McConnel und Barton, 1995; Lynn et al., 1999). *PNH/ZLL* gehört zu PAZ/PIWI-Proteinfamilie. *pnh/zll*-Mutanten zeigen einen pleiotropen Phänotyp. Dabei weisen *pnh/zll*-Mutanten unter anderem ein vergrößertes Meristem und verdickte Schoten auf.

In Tomate ist die *blind(bl)*-Mutante identifiziert worden, bei der die Anlage von Seitentrieben in den meisten Blattachsen ist unterdrückt. *BLIND* gehört zur Familie der R₂R₃-Myb-Transkriptionsfaktoren (Schmitz et al., 2002).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Studie steht die *lateral suppressor*-Mutante aus *Arabidopsis* (Greb et al., 2003). Wie in Abbildung 1.2. gezeigt, ist in *las*-Mutanten in den Achseln von Rosettenblättern die Initiation von Lateralmeristemen unterdrückt. Dagegen werden Seitensprosse in den Achseln der Stängelblätter angelegt. Das *LAS*-Gen ist ein Mitglied der GRAS-Genfamilie. *LAS* ist in einer schmalen Domäne an der adaxialen Basis von Blattprimordien exprimiert. Die Expression wurde bereits vom P₁-Primordium an beobachtet (Greb et al., 2003). Da in älteren Blattachsen von *las-4* Mutanten keine Expression von *STM* detektiert wurde, ist dort die Initiation von Achselmeristemen in einer frühen Entwicklungsphase gestört (Greb et al., 2003).

Außerdem konnten Greb et al. (2003) nachweisen, dass *LAS*-Transkripte in Achseln von *revoluta*-Mutanten gefunden wurden, dagegen wurde in Blattachsen vegetativer Blätter bei *las-4*-Mutanten keine *REV*-Expression gefunden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die *LAS*-Funktion früher in der Entwicklung gebraucht wird als die *REV*-Funktion.

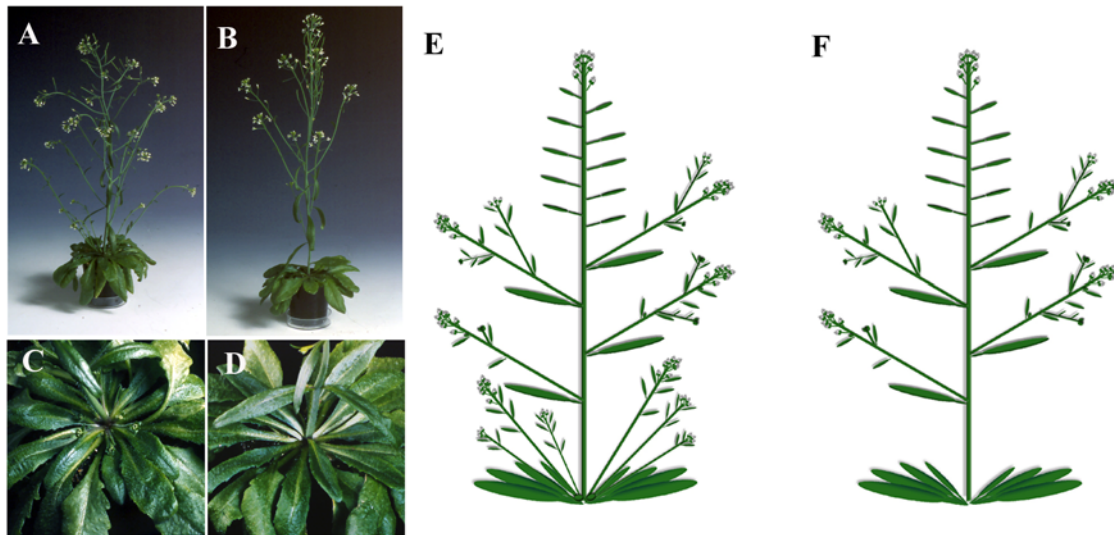


Abb.1.2.:Phänotypische Charakterisierung der *las-4*-Mutante. **A:** Habitus einer Columbia-Pflanze. **B:** Habitus einer *las-4*-Pflanze. **C:** Nahaufnahme der Blattrosette einer Columbia-flanze. **D:** Nahaufnahme der Blattrosette einer *las-4*-Pflanze. **E:** Schematische Darstellung des Verzweigungsmuster einer Columbia-Planze. **F:** Schematische Darstellung des Verzweigungsmuster einer *las-4*-Mutante.

Weitere Studien haben gezeigt, dass die Funktion von *LAS* im Pflanzenreich konserviert ist. Die *lateral suppressor-(ls)* Mutante aus Tomate trägt eine Mutation im orthologen Gen (Schmitz et al., 1999; Rossberg et al., 2001). In der *ls*-Mutante wird in den meisten Fällen nur der sympodiale Spross, der bei der Bildung einer Infloreszenz die Hauptachse fortführt, ausgebildet. Abgesehen von der nächstjüngeren Blattachsel legen die anderen Blattachsen keine Triebe an. *Arabidopsis* zeigt im Gegensatz zu Tomate ein monopodiales Verzweigungsmuster, d.h. das primäre SAM bildet während der gesamten Lebenszeit die Hauptachse der Pflanze. Bezieht man dies in die Bewertung der Phänotypen von *las* und *ls* ein, zeigen beide in den Achseln vegetativer Blätter eine Unterdrückung der Seitentriebbildung. Dass die Funktion von *LAS* hoch konserviert ist, zeigt die Transkomplementation der Tomaten *ls*-Mutante mit einem genomischen Fragment, das das offene Leseraster und regulatorische Elemente des *Arabidopsis LAS*-Gens umfasst (Greb et al., 2003). Li et al. (2003) beschreiben die Mutation im orthologen Gen aus Reis, *MONOCULMI (MOC1)*. In *moc1*-Mutanten ist die Anlage der vegetativen Tiller unterdrückt. Somit kann man sagen, dass die Funktion auch zwischen Monokotyledonen und Dikotyledonen Pflanzen konserviert ist.

In der Familie der GRAS-Gene wurde diese Konservierung auch für andere Genfunktionen gefunden. So resultieren Mutationen, die zu einem Funktionsverlust der DELLA-Domänen Proteine *REPRESSOR OF GA1-3 (RGA)* oder *GIBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI)* führen in einem Phänotyp, der einer konstitutiven Antwort auf das Phytohormon GA gleicht

(Di Laurenzio et al., 1996; Silverstone et al., 1998). Ein ähnlicher Phänotyp wird auch in der *slender rice-(slr)* Mutante in Reis beobachtet (Itoh et al., 2002). Sie wird verursacht durch eine Mutation im *OsGAI*-Gen. Dies deutet darauf hin, dass GRAS-Gene im Pflanzenreich für grundlegende Entwicklungsprozesse benötigt werden. Was könnte also diese gemeinsame Funktion sein?

Obwohl DNS-Bindung noch nicht nachgewiesen werden konnte ist es wahrscheinlich, dass GRAS-Gene als Transkriptionsfaktoren wirken. Für *MOCl*, *RGA*, *OsGAI*, *RGA-LIKE1 (RGL1)*, *LISCL (Lilium longiflorum scarecrow-like)*, *SCARECROW (SCR)* und *SHORTROOT (SHR)* konnte eine Kernlokalisation nachgewiesen werden (Li et al., 2003; Silverstone et al., 1998; Itoh et al., 2002; Nakajima et al., 2001; Morohashi et al., 2003). Die Analyse verschiedener GRAS-Gene legt die Vermutung nahe, dass sie eine Funktion bei der Differenzierung von Zellen haben. So spielen *SCARECROW (SCR)* und *SHORTROOT (SHR)* eine wichtige Rolle bei der radiären Musterbildung in der Wurzel (Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000). Interessanterweise wirkt *SHR* dabei nicht zellautonom, sondern kann in eine benachbarte Zellschicht wandern und dort in den Nukleus gelangen (Nakajima et al., 2001). Das *HAIRY MERISTEM (HAM)*-Gen aus Petunie wirkt ebenfalls nicht zellautonom und schützt das SAM davor, zu differenzieren (Stuurman et al., 2002). In *ham*-Mutanten terminieren das SAM und die Lateralmeristeme und bilden eine differenzierte Epidermis mit Trichomen. Des weiteren ist anzumerken, dass *RGA* und *GAI* ebenfalls indirekt Zelldifferenzierung beeinflussen, indem sie die Signaltransduktion des Phytohormons GA modulieren (Silverstone et al., 1998; Übersichtsartikel: Bolle, 2004)

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, durch einen genetischen Ansatz die Funktion des *LATERAL SUPPRESSOR*-Gens bei der Anlage von Achselmeristemen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Doppelmutanten von *las* und Mutanten hergestellt, die Defekte verwandten Entwicklungsprozessen aufweisen. Es sollte dabei die Hierarchiebeziehung der Gene zueinander analysiert werden. Des Weiteren sollten dabei mit *LAS* redundante Genfunktionen aufgedeckt werden.

In einem zweiten Ansatz wurden Samen einer homozygoten *las-4* Pflanze chemisch mutagenisiert und die Nachkommen in der M₂-Generation nach Mutanten durchmustert, die den *las-4*-Verzweigungsphänotyp entweder verstärken oder unterdrücken. Identifizierte Mutanten sollten charakterisiert werden und der mutierte Locus kartiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die wichtigsten Bezugsquellen für verwendete Chemikalien:

Merck KGaA, Feinchemikalien und Laborbedarf Deutschland, Darmstadt

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

DuchEFA, Haarlem, Niederlande

Sigma Chemical Co., St. Lois, USA

Biozym, Hess. Oldendorf

Amersham Pharmacia Biotec, Braunschweig

Roche, Basel, Schweiz

Pierce, Rockford, Illinois, USA

2.1.2 Enzyme

Die wichtigsten Bezugsquellen für verwendete Enzyme:

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

New England BioLabs GmbH, Schwalbach/Taunus

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Inkubationsröhrchen Greiner Labortechnik

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Kits zur Nukleinsäurebehandlung: Qiagen, Hildesheim

2.1.4 Organismen

2.1.4.1 Pflanzen

Alle Untersuchungen wurden an Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana* Neynh. vom Ökotyp Columbia and Landsberg *erecta* durchgeführt. Für Doppelmutantenanalysen und EMS Mutagenese wurde nur das *las-4* Allel der *las* Mutante verwendet, das eine 20 bp Deletion an Position bp 365 des offenen Leserasters trägt. Samenmaterial wurde mit wenigen in der folgenden Tabelle vermerkten Ausnahmen vom Nottingham Stock Centre (NASC) bezogen.

Mutante	Allel	Bezugs- quelle	NASC accession	genetischer Hintergrund
<i>revoluta</i>	<i>rev-5</i>	Comai	--	Columbia
<i>auxin resistant1</i>	<i>axr1-12</i>	NASC	N3076	Columbia
<i>more axillary shoots1</i>	<i>max1-1</i>	O. Leyser	--	Columbia
<i>more axillary shoots2</i>	<i>max2-1</i>	O. Leyser	--	Columbia
<i>more axillary shoots1</i>	<i>max3-1</i>	O. Leyser	--	Columbia
<i>agamous</i>	<i>ag-1</i>	NASC	NW25	Landsberg <i>erecta</i>
<i>apetala1</i>	<i>ap1-10</i>	NASC		Columbia
<i>leafy</i>	<i>lfy-14</i>	NASC		Columbia
<i>carpel factory</i>	<i>caf-1</i>	NASC	N3828	Landsberg <i>erecta</i>
<i>shootmeristemless</i>	<i>stm-2</i>	NASC	N8137	Landsberg <i>erecta</i>
<i>wuschel</i>	<i>wus-1</i>	NASC	N15	Landsberg <i>erecta</i>
<i>clavata3</i>	<i>clv3-2</i>	NASC	N8066	Landsberg <i>erecta</i>

2.1.4.2 Molekulare Marker zur Unterscheidung der mutanten Allele

Allel	Mutation	Polymorphismus	CAPS-Marker	PCR Bedingungen
<i>las-4</i>	20 bp Del. in <i>las-4</i>	SpeI schneidet in <i>las-4</i> , nicht im Wt	mTest_ <i>las-4</i> : Atls2349F + Atls3132R	61°C annealing 30 sec elongation 32 Zyklen
<i>axr1-12</i>	Base C2536 zu T Stopcodon	DraI schneidet in <i>axr1-12</i> , nicht in Wt	mTest_ <i>axr1-12</i> : AXR2282-F + AXR3199-R	60°C annealing 30 sec elongation 32 Zyklen
<i>rev-5</i>	Base 779 C zu T; AS 260 V statt A	in <i>rev-5</i> neu RSAI –Schnittst.	mTest_ <i>rev-5</i> : REV427F * REV1127R	60 °C annealing 30 sec elongation 32 Zyklen

Nach Restriktionsspaltung wurden die Fragmente auf 2 % Agarose Gel (1% Agarose+1% *low melting point* Agarose) aufgetrennt (120 V)

2.1.5 Oligonukleotide

2.1.5.1 SSLP-Marker für Kartierung

Name	5'-3' Orientierung
F21M12-F	GGC TTT CTC GAA ATC TGT CC
F21M12-R	TTA CTT TTT GCC TCT TGT CAT TG
ciw12-F	AGG TTT TAT TGC TTT TCA CA
ciw12-R	CTT TCA AAA GCA CAT CAC A
ciw1-F	ACA TTT TCT CAA CCT TAC TC
ciw1-R	GAG AGC TTC TTT ATT TGT GAT
nga280-F	CTG ATC TCA CGG ACA ATA GTG C
nga280-R	GGC TCC ATA AAA AGT GCA CC
nga111-F	TGT TTT TTA GGA CAA ATG GCG
nga111-R	CTC CAG TTG GAA GCT AAA GGG
ciw3-F	GAA ACT CAA TGA AAT CCA CTT
ciw3-R	TGA ACT TGT TGT GAG CTT TGA

nga1126-F	CGC TAC GCT TTT CGG TAA AG
nga168-R	GAG GAC ATG TAT AGG AGC CTCG
nga162-F	CAT GCA ATT TGC ATC TGA GG
nga162-R	CTC TGT CAC TCT TTT CCT CTG G
ciw11-F	CCC CGA GTT GAG GTA TT
ciw11-R	GAA GAA ATT CCT AAA GCA TTC
ciw4-F	GTT CAT TAA ACT TGC GTG TGT
ciw4-R	TAC GGT CAG ATT GAG TGA TTC
nga6-F	TGG ATT TCT TCC TCT CTT CAC
nga6-R	ATG GAG AAG CTT ACA CTG ATC
ciw5-F	GGT TAA AAA TTA GGG TTA CGA
ciw5-R	AGA TTT ACG TGG AAG CAA T
ciw7-F	AAT TTG GAG ATT AGC TG GAA T
ciw7-R	CCATGTTGATGATAAGCACAA
nga1107-F	GCG AAA AAA CAA AAA AAT CCA
nga1107-R	CGA CGA ATC GAC AGA ATT AGG
CTR1-F	CCA CTT GTT TCT CTC TCT AG
CTR1-R	TAT CAA CAG AAA CGC ACC GAG
ciw8-F	TAG TGA AAC CTT TCT CAG AT
ciw8-R	TTA TGT TTT CTT CAA TCA GTT
PHYC-F	CTC AGA GAA TTC CCA GAA AAA TCT
PHYC-R	AAA CTC GAG AGT TTT GTC TAG ATC
ciw9-F	CAGACGTATCAAATGACAAATG
ciw9-R	GACTACTGCTCAAACCTATTCGG
ciw10-F	CCA CAT TTT CCT TCT TTC ATA
ciw10-R	CAA CAT TTA GCA AAT CAA CTT
nga392-F	GGT GTT AAA TGC GGT GTT C
nga392-R	TTG AAT AAT TTG TAG CCA TG
SO392-F	GTT GAT CGC AGC TTG ATA AGC
SO392-R	TTT GGA GTT AGA CAC GGA TCT G
7G6-F	GGT TTA CTT AGT CCA ATG GTA G
7G6-R	GGG TCT GGT TAT GCC GTG AAG
M235-F	AGT CCA CAA TTG CAG CC
M235-R	GAA TCT GTT TCG CCT AAC GC

NF21J9-F	GAG ACG AAG AAG ATG GAT TCT G
NF21J9-R	CAG ATT TCT TGC CAA GTT TCA TC
ZFBP-F	TGG GTC AAT TCA CAT GTA GAG A
ZFBP-R	TTG CGT TTC CAC ATT TGT TT
Mi342-F	GAA GTA CAG CGG CTC AAA AAG AAG
Mi342-R	TTG CTG CCA TGT AAT ACC TAA GTG
T6P5-4.8-F	TGA AAG ACA CCT GGG ATA GGC
T6P5-4.8-R	CCA ACT TTC GGG TCG CTT CC
M323-F	GCT TTG CTT GGC TTG AAC AG
M323-R	CGG TTG AAG AAG CCT GAA GT
MBK-5-F	GAG CAT TTC ACA GAG ACG
MBK5-R	ATC ACT GTT GTT TAC CAT TA
FCA11-F	CGG TAT CTC CAG GTG CGA GAC
FCA11-R	GAG GAC AAA CAT AAC TAC TGA TAC
NGA392-F	GGT GTT AAA TGC GGT GTT C
NGA392-R	TTG AAT AAT TTG TAG CCA TG

2.1.5.2 CAPS-Marker für Kartierung

Name	TAIR accession	Oligonukleotide	Restriktionsenzym
7G6	GeneticMarker: 1945553	7G6-F + 7G6-R	AccI
M235	GeneticMarker: 1945678	M235-F + M235-R	HindIII
T6P5-4.8	GeneticMarker: 2005304	T6P5-4.8-F + T6P5-4.8-R	HindIII
M323	GeneticMarker: 1945682	M323-F + M323-R	HinfI
Mi342	GeneticMarker: 2005273	Mi342-F + Mi342-R	HinfI
FCA11	GeneticMarker: 2005329	FCA11-F + FCA11-R	DraI

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von metabion, Planegg-Martinsried oder von Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

2.1.6 Computerprogramme und Datenbanken

Für Datenbankrecherchen wurde die *Arabidopsis Information Ressource* (TAIR) (Huala et al. 2001) verwendet. Für Sequenzsuchen und –vergleiche wurde das Programm *Blast* genutzt. Aus dieser Datenbank sind neue CAPS bzw. SSLP Marker entnommen worden. Mit Hilfe des UWGCG Programmpaketes (Genetics Computer Group, 1997) konnten Sequenzanalysen und Bearbeitung durchgeführt werden.

2.2 Methoden

Alle nicht beschriebenen gängigen Labormethoden wurden nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt.

2.2.1 Genetische Kartierung

Wenn nicht anders angegeben wurde die Kartierung nach Lukowitz et al. (2000) durchgeführt.

2.2.2 Isolierung von DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte unter Verwendung des *Plasmid Midi Kits* (Quiagen). PCR Produkte wurden mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt. Pflanzen-DNA wurde nach Brandstaedter et al. (1994) isoliert.

2.2.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Wenn nicht anders angegeben wurde eine PCR-Reaktion wie folgt angesetzt:

5 µl 10x PCR-Puffer (Sambrook und Russel, 2001); 1,5 µl MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl dNTP (25 mM je Nukleotid), 0,2 µl Taq-Polymerase und je 2 µl Primer (10pmol/µl) wurden auf 50 µl mit H₂O aufgefüllt.

Als Vorlage wurde 1 µl der jeweiligen DNA (max 20 ng) eingesetzt. Die Taq-Polymerase wurde von Elisabeth Schäfer nach dem Protokoll von Pluthero (1993) hergestellt.

Wenn nicht anders angegeben, wurde die PCR-Reaktion folgendermaßen durchgeführt.

Denaturierung bei 95 °C für 3 min

Denaturierung bei 94°C für 20 sec

Annealing bei 58°C für 30 sec

Extension bei 72 °C für 1 min

Extension bei 72°C für 5 min

Herunterkühlen auf 20°C

Die Schritte 2-4 wurden generell 32 mal wiederholt. Die verwendeten PCR-Maschinen waren entweder der T3 Thermocycler von Biometra oder der Biozym Multicycler PTC 225.

2.2.4 Wachstumsbedingungen für Pflanzen

Die Anzucht der *Arabidopsis* Pflanzen fand entweder in Klimakammern unter Kurztag-Bedingungen (8h Licht, 16h Dunkelheit) oder in klimatisierten Gewächshäusern unter Kurz- bzw. Langtagbedingungen (16h Licht, 8 h Dunkelheit) statt. In den Gewächshäusern konnte bei Bedarf zusätzliches Licht verwendet werden, durch automatisch zu steuernde Schattierungen wurde gezielt Dunkelheit erzeugt. Die Tagestemperatur betrug 20-25 °C und die Nachttemperatur 10-15 °C.

2.2.5 Kreuzungen von Pflanzen

Falls nicht anders angemerkt wurden jeweils *las-4* Pflanzen als Pollen-Akzeptor vorbereitet. Zunächst wurden an einer jungen Infloreszenz das Meristem entfernt und alle bereits geöffneten Blüten. An nicht geöffneten Blüten wurden Sepalen, Petalen und Stamen vorsichtig vollständig entfernt. Anschließend wurde etwa 2 Tage gewartet bis sich sichtbar die

Stigmata ausgebildet hatten. Vom Pollendonor wurden Blüten mit der Pinzette abgenommen um die vorbereiteten Blüten damit zu bestäuben. Anschließend wurde unter Vergrößerung überprüft ob gelber Pollenstaub auf des Stigmata sichtbar war.

Die F₁-Generation wurde jeweils auf das Auftreten des Wildtyp-Phänotyps überprüft.

Im Fall von homozygot sterilen Mutationen wurden heterozygote Pflanzen aus einer segregierenden Population entnommen. Die Heterozygotie wurde entweder durch einen molekularen CAPS-Marker oder durch phänotypische Analyse der Nachkommen der Pflanze bestätigt.

2.2.6 Sequenzierungen

DNS-Sequenzierungen wurden durch die MPIZ Service-Einheit *Automatische DNA Isolierung und sequenzierung* (ADIS) auf *Applied Biosystems* (Weierstadt) *Abi Prism 377* und *3700* Sequenzierern mittels *BigDye-terminator* chemistry durchgeführt. Reagenzien wurden von *Applied Biosystems* bezogen.

2.2.7 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopie (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) wurde mit Unterstützung von Rolf-Dieter Hirz an einem DSM 940 (Zeiss) durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde dazu zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und im Vakuum mit einer Goldschicht bedampft.

2.3 Verwendete Abkürzungen

Die Verwendete Maßeinheiten richten sich nach dem System für internationale Maßeinheiten und die chemische Elemente werden mit den gängigen Abkürzungen bezeichnet.

Abb	Abbildung
AG	AGAMOUS
AS1	ASYMMETRIC LEAVES 1
AP1	APETALA1
AP2	APETALA2

<i>AP3</i>	<i>APETALA3</i>
<i>AXR1</i>	<i>AUXIN RESISTANT1</i>
bp	Basenpaar
<i>Bl</i>	<i>Blind</i>
<i>BUS</i>	<i>BUSHY</i>
<i>CAF</i>	<i>CARPEL FACTORY</i>
CAPS	cleaved-amplified-polymorphic-sequence
<i>CLV</i>	<i>CLAVATA</i>
Col	Columbia
DNS	Desoxyribonucleinsäure
<i>EOL</i>	<i>ENHANCER OF las-4</i>
GA	Gibberellinsäure
<i>GAI</i>	<i>GIBBERELIC ACID INSENSITIVE</i>
<i>HAM</i>	<i>HAIRY MERISTEM</i>
<i>IFL</i>	<i>INTERFASCICULAR FIBRELESS</i>
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
<i>KNAT</i>	<i>KNOX</i> -Gene aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>KNOX</i>	Knotted1-ähnliche Homeobox-Gene
<i>LAS</i>	<i>LATERAL SUPPRESSOR</i> aus <i>Arabidopsis</i>
<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i>
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>LFY</i>	<i>LEAFY</i>
Ls	Lateral suppressor aus Tomate
<i>MAX</i>	<i>MORE AXILLARY GROWTH</i>
Mb	Megabasen
<i>MOC1</i>	<i>MONOCULMI</i>
mRNA	Boten-RNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>PNH</i>	<i>PINHEAD</i>
RAM	root apical meristem
<i>REV</i>	<i>REVOLUTA</i>
<i>RG1</i>	<i>REPRESSOR OF GAI-3</i>
RNA	Ribonucleinsäure

RT	Raumtemperatur
SAM	Sprossapikalmeristem
SEM	Scanning Electron Microscopy
<i>SCR</i>	<i>SCARECROW</i>
<i>SHR</i>	<i>SHORTROOT</i>
<i>SPY</i>	<i>SPINDLY</i>
<i>SPS</i>	<i>SUPERSHOOT</i>
<i>STM</i>	<i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
SSLP	simple-sequence-length-polymorphisms
ÜN	über Nacht
<i>WUS</i>	<i>WUSCHEL</i>
<i>ZLL</i>	<i>ZWILLE</i>

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten die Funktion von *LATERAL SUPPRESSOR* bei der Initiation von Achselmeristemen charakterisiert werden und unbekannte, an dem Prozess beteiligte Gene identifiziert werden. Zu diesem Zweck sind in dieser Arbeit zwei Strategien verwendet worden. Zum einen sollten durch die Analyse von Doppelmutanten von *las* und verschiedenen Entwicklungsmutanten genetische Interaktionen aufgedeckt werden. Es wurde dafür das starke Deletionsallel *las-4* verwendet. Zum anderen wurde in einem Mutagenese-Ansatz die *las-4*-Mutante als Ausgangspunkt zur Identifizierung unbekannter Gene genutzt. Bei der Durchmusterung der Nachkommen von EMS mutagenisierten *las-4*-Samen wurden Mutationen näher charakterisiert, die zu einer Verstärkung des *las-4*-Phänotyps führen. In einem auf der Verwendung von PCR-Marker basierenden Ansatz wurde für ein Kandidatengen eine Kartenposition bestimmt.

3.1 Genetische Analyse der Funktion von LAS durch Doppelmutantenanalysen

3.1.1 Allgemeine Vorbemerkungen zur Doppelmutantenanalyse

Das *LATERAL SUPPRESSOR*-Gen ist zur Initiation von Achselmeristemen während der vegetativen Wachstumsphase notwendig (Greb et al., 2003). Mutationen in den orthologen Genen in *Arabidopsis*, Tomate und Reis führen zu einem vergleichbaren Phänotyp (Greb et al., 2003; Schuhmacher et al., 1999; Li et al., 2003). Die Funktion von *LATERAL SUPPRESSOR* ist offensichtlich Teil eines sehr grundlegenden Regulationsmechanismus, der bei höheren Pflanzen konserviert ist. Trotz detaillierter Expressionsstudien und anderer experimenteller Ansätze ist relativ wenig darüber bekannt, welche anderen Gene mit *LAS* interagieren. Deshalb wurde *las-4* gezielt mit anderen Mutationen kombiniert, die jeweils spezifisch in verschiedenen Phasen der Entwicklung einer *Arabidopsis*-Pflanze Störungen hervorrufen. Die genetische Analyse von Doppelmutanten kann wichtige Informationen zur Charakterisierung einer Gen-Funktion liefern. Eine nahe liegende Fragestellung ist die Hierarchiebeziehung der beiden betroffenen Gene zueinander. In *Arabidopsis* sind mehrere Mutationen charakterisiert worden, die zu einem verstärkten Auswachsen von Seitentrieben führen. Im Gegensatz dazu führen andere Mutationen wie *las-4* dazu, dass alle oder einige

vegetative Blattachsen die Fähigkeit verlieren, Seitensprosse zu bilden. Da sich beide Mutationen entgegengesetzt auswirken, wird sich bei deren Kombination diejenige phänotypisch auswirken, deren Loci den früheren Entwicklungsprozess reguliert. Eine andere Möglichkeit ist die Kombination von *las-4* mit anderen Mutationen, die zu einer Unterdrückung der Seitentriebentwicklung führen, wie beispielsweise *revoluta*. Steuern beide Gene den betroffenen Entwicklungsweg über unabhängige Regulationswege, kann eine Kombination beider Mutationen zu einer Verstärkung des Phänotyps führen. Greifen sie hingegen regulierend in denselben Regulationsweg ein ist anzunehmen, dass die Doppelmutante in Bezug auf den analysierten Entwicklungsdefekt beiden Ausgangsmutanten gleicht. Eine häufig beobachtete Variante ist, dass zwei Gene einen Entwicklungsprozess parallel beeinflussen. Das führt dazu, dass in den Einzelmutanten der Prozess jeweils von dem anderen Locus reguliert wird, er also normal ablaufen kann und nicht zu einem veränderten Phänotyp führt, dies wird als Redundanz bezeichnet. Fallen beide Genfunktionen aus, kann der jeweilige Prozess nicht mehr normal ablaufen und resultiert in einem veränderten Aussehen der Pflanze. Dadurch kann man auch vorher unbekannte weil verdeckte Funktionen von Genen aufdecken.

3.1.2 Charakterisierung von *las-4/axr1-12*-Doppelmutanten

3.1.2.1 Herstellung der Doppelmutanten

Aufgrund histologischer Untersuchungen, Dekapitierungsexperimenten an *las-4*-Pflanzen und nicht zuletzt dem Nachweis der frühen und spezifischen Expression von *LAS*-Transkripten bereits an der adaxialen Basis von P1-Blattprimordien (Greb et al., 2003), gibt es zahlreiche Hinweise, dass die *LAS*-Funktion in einem frühen Stadium zur Initiation von Lateralmeristemen benötigt wird. Während in *las-4*-Pflanzen keine Seitentriebe aus den Achseln von Rosettenblättern gebildet werden, führt die *auxin resistant1-12-(axr1-12)* Mutation zu einer Reduktion der Apikaldominanz und dadurch zu einem verstärktem Auswachsen von Seitentrieben was zu dem buschigen Erscheinungsbild der Pflanzen führt. In diesem Experiment sollte untersucht werden, welche der beiden Mutationen sich epistatisch der anderen gegenüber verhält, deshalb wurde eine Doppelmutante aus *las-4*- und der *axr1-12*-Mutante hergestellt.

Die *axr1-12*-Mutante wurde in einem *Screening* für Auxin-sensitive Mutanten isoliert (Estelle and Somerville, 1987) und zeigt pleiotrope Effekte (Lincoln et al., 1990) so wie reduzierte

Apikaldominanz (Stirnberg et al., 1999). Bei der *axr1-12*-Mutation handelt es sich um einen Basenaustausch, der zur Bildung eines Stop-Codons in Exon 11 und somit vermutlich zu einem völligen Funktionsverlust des Proteins führt (Leyser et al., 1993). Das *axr1-12*-Allel und *las-4* befinden sich im selben Hintergrund, was bei einer Kreuzung den Einfluss des genetischen Hintergrundes minimiert.

Die Durchführung der Kreuzung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5 angegeben. In der F₂-Generation wurden Nachkommen von zwei unabhängigen F₁-Pflanzen analysiert.

Die Auswertung der F₂-Generation zeigte die Aufspaltung 4 unterschiedlicher Phänotypgruppen. So wurden zusätzlich zu Wildtyp-Pflanzen, *las-4*-Mutanten und *axr1-12*-Mutanten noch Pflanzen gefunden, die in Blattform und Sprosslänge *axr1-12*-Mutanten glichen aber kaum Seitentriebe aus der Rosette bildeten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1. zusammengefasst.

	Keimungsrate	Wt	<i>axr1-12</i>	<i>las-4</i>	<i>axr1-12 /las-4</i>
Linie 1	74%	29	12	6	5
(Erwartung)	52/70 gekeimt	(29,25)	(9,75)	(9,75)	(3,25)
Linie2	49 %	18	6	8	2
(Erwartung)	34/70 gekeimt	(19,125)	(6,375)	(6,375)	(2,125)

Tabelle 3.1. Ergebnis der phänotypischen Auswertung der F₂-Generation der Kreuzung zwischen *axr1-12* und *las-4*. Die Werte der theoretischen Segregation errechnen sich aus der erwarteten 9 : 3 : 3 : 1 (Wt : Phänotyp 1 : Phänotyp 2 : Doppelmutante) Aufspaltung, bezogen auf die Zahl der tatsächlich gekeimten Pflanzen. Weitere Angaben im Text.

Die Keimungsraten für Linie 1 (74%) und Linie 2 (49%) waren sehr niedrig. Dies wird darauf zurückgeführt, dass die Ruhezeit der Samen nach dem Abreifen der F₁-Pflanzen nicht lang genug war. Die Segregation eines letalen Phänotyps ist unwahrscheinlich, da die Segregationsverhältnisse beider Linien wie im Folgenden besprochen einer 9:3:3:1 Segregation entsprechen. Wie in Tabelle 1 gezeigt, konnten bei Linie 1 29 wildtypische Pflanzen, 6 *las-4*-Pflanzen, 12 *axr1-12*-Pflanzen und 5 Doppelmutanten identifiziert werden (Abb. 3.1. A von links nach rechts). Die Doppelmutanten zeigten in Sprosslänge und Blattform einen *axr1-12*-Phänotyp, produzierten aber nur wenige Seitentriebe aus Achseln von Rosettenblättern. In Abbildung 3.1. B ist die Blattrosette einer Pflanze mit *axr1-12*-Phänotyp in einer Nahaufnahme gezeigt. Zu beobachten ist ein Auswachsen von Seitentrieben aus einer großen Anzahl von Blattachseln. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 3.1.C die

Nahaufnahme der Blattrosette einer *axr1-12/las-4*-Pflanze ohne Seitentriebe aus der Rosette. Der Pfeil markiert die Blattbasis, an der in *axr1-12*-Mutanten Seitentriebe auswachsen. Die gleichen Phänotypgruppen wurden in Linie 2 gefunden. Es konnten 18 Wildtypen, 8 *las-4*-Pflanzen, 6 *axr1-12*-Phänotypen sowie 2 Doppelmutanten identifiziert werden. Ein Vergleich der für beide Linien beobachteten Segregation mit der erwarteten 9:3:3:1-Aufspaltung der Phänotypen in Tabelle 3.1, ist zu bemerken, dass die tatsächliche Segregation trotz leichter Abweichung der Erwartung entspricht.

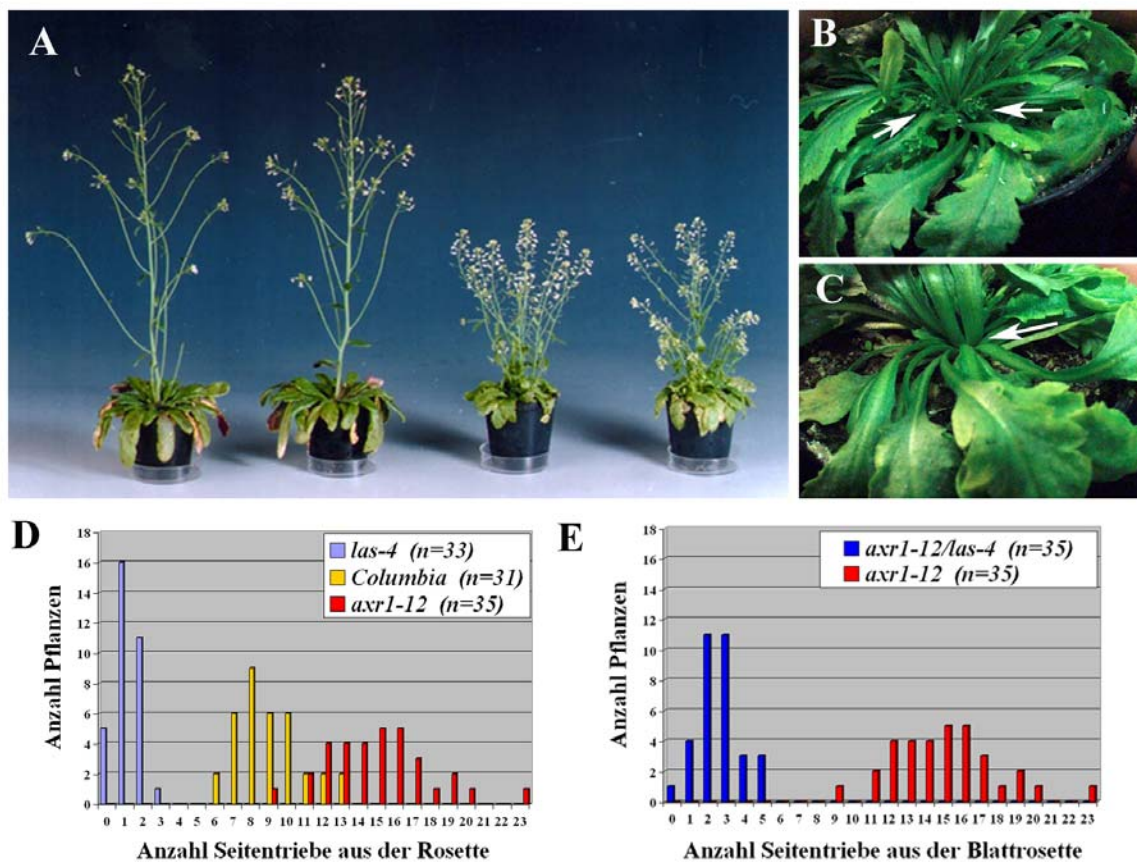


Abb.3-1: Phänotyp von *axr1-12* (A,B) und *las-4/axr1-12*-Mutanten (A,C). **A:** v.l. nach rechts *Columbia*, *las-4*, *axr1-12/las-4* und *axr1-12*. **B:** Focus auf die Rosette einer *axr1-12*-Pflanze, Pfeile markieren Blattachsen mit Seitentrieben. **C:** Rosette einer *axr1-12/las-4*-Pflanze ohne Seitentriebe, der Pfeil markiert leere Blattachsen. Die Diagramme **D-E** zeigen die Ergebnisse eines Dekapitierungs-Experimentes. Der Haupttrieb von *Columbia*-Pflanzen (**D**) sowie *las-4*- (**E**), *axr1-12*- (**D,E**) und *las-4/axr1-12*-Mutanten (**E**) wurde zum Zeitpunkt des Öffnens der ersten Blüten oberhalb der Rosette entfernt und 10 Tage später die ausgewachsenen Seitentriebe gezählt. Weitere Beschreibung im Text.

Zur molekularen Bestätigung der phänotypisch festgestellten Segregationsverhältnisse wurden molekulare *cleaved-amplified-polymorphic-sequences* (CAPS)-Marker verwendet. Zum Test auf *las-4* diente der Marker mTest_ *las-4* und auf *axr1-12* wurde mit mTest_ *axr1-12* geprüft

(Abschnitt 2.1.4.2.). So stellte sich heraus, dass keine der getesteten Pflanzen mit *las-4* Phänotyp homozygot für *axr1-12* war und keine der *axr1-12*-Pflanzen homozygot für *las-4* und *axr1-12*. Dagegen waren die getesteten Pflanzen mit Doppelmutantenphänotyp homozygot für *las-4*. Dadurch konnte auf molekularer Ebene bestätigt werden, dass es sich bei der Gruppe von Pflanzen, die in Sprosslänge und Blattform der *axr1-12*-Mutante glichen, aber eine starke Suppression der Seitentriebbildung aus der Rosette aufwiesen, tatsächlich um *axr1-12/las-4*-Doppelmutanten handelte.

3.1.2.2 Dekapitierungsanalyse

Bei diesem Experiment wurde jeweils der Hauptspross von *axr1-12*-, *las-4/axr1-12*- sowie von Columbia- und *las-4*-Kontrollen oberhalb der Blattrosette entfernt. Die Spitze des Hauptsprosses dient als Quelle für hormonelle Signale, die ein Auswachsen der Knospen in der Blattrosette unterdrücken (Cline, 1997; Napoli et al., 1999). In Wildtyp-Pflanzen erhöht sich dadurch die Zahl der Seitentriebe, die aus der Blattrosette auswachsen.

Bei den in diesem Experiment verwendeten Doppelmutanten handelte es sich um Nachkommen einer homozygoten *las-4/axr1-12*-Pflanze, die nach molekularer Bestätigung aus der F₂-Generation ausgewählt wurde. Die Pflanzen wurden für 3 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen, um die Zahl der Rosettenblätter zu erhöhen, und anschließend zur Blühinduktion in Langtagbedingungen überführt. Columbia- und *las-4*-Pflanzen wurden bei einer Sprosslänge von 10-15 cm dekapitiert.

Das Kriterium der Sprosslänge konnte auf Grund des Zwergwuchses bei *axr1-12* und der Doppelmutante nicht angewendet werden. Statt dessen wurde der Hauptspross nach dem Öffnen der ersten Blüten entfernt. Nach 10 Tagen wurden die von Achseln der Rosettenblättern ausgewachsenen Triebe gezählt. Triebe, die weniger als 0,5 cm lang waren sind nicht berücksichtigt worden.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in den Abbildungen 3.1 D und E illustriert.

Wie im Balkendiagramm 3.1. D zu sehen ist, wachsen bei den meisten Columbia-Pflanzen etwa 7-10 Seitentriebe aus, wobei ein Schwerpunkt bei 8 Seitentrieben liegt. Eine deutliche Verschiebung ist bei *axr1-12*-Pflanzen zu beobachten (Abb. 3.1. D). Zunächst fällt eine breitere Streuung der Werte auf. Mit dem Austreiben von 12-16 Seitentrieben bei der Mehrzahl der Pflanzen und dem Auswachsen von bis zu 23 Seitentrieben wird aber ein deutlicher Unterschied zum Wildtyp sichtbar. Ein Vergleich der Versuchsergebnisse von *las-4*

und Columbia (Abb. 3.1. D) zeigt, dass *las-4*-Mutanten keine bis 3 Seitentriebe bilden, bei der Mehrzahl der Pflanzen treibt lediglich 1 Seitentrieb aus. Eine durchgängige Beobachtung war, dass alle in der Rosette von *las-4*-Mutanten gebildeten Seitentriebe aus den Achseln der obersten Blätter ausgewachsen sind. Die Werte von Columbia zeigen keine Überschneidung mit denen von *las-4*. Dieses Resultat bestätigt die Annahme, dass der Phänotyp von *las-4* nicht durch eine vom Hauptspross induzierte erhöhte Apikaldominanz ausgelöst wird (Greb et al., 2003). In Abbildung 3.1.E werden die Versuchsergebnisse von *axr1-12/las-4*- und *axr1-12*-Mutanten dargestellt. Ein Vergleich der bereits in 3.1.D angegebenen Werte von vielen *axr1-12*-Pflanzen mit 12-16 Seitentrieben und denen der Doppelmutanten mit 0-5 Seitentrieben und einem Schwerpunkt bei 2-3 Seitentrieben zeigt eine starke Verschiebung zu weniger Seitentrieben bei Doppelmutanten gegenüber *axr1-12*. Vergleicht man allerdings die Werte von *axr1-12/las-4*-Pflanzen mit denen von *las-4* (Abb.3.1.D) wird deutlich, dass einige Doppelmutanten mehr Seitentriebe ausbilden als die *las-4*-Einzelmutante. Außerdem verlagert sich der Schwerpunkt: in *las-4* bildet die Mehrzahl der Pflanzen 1 Seitentrieb aus, in *axr1-12/las-4* hingegen 2-3. Wie bereits für *las-4* erwähnt, treiben auch alle bei Doppelmutanten beobachteten Seitentriebe aus den Achseln der obersten Rosettenblätter aus. Das Ergebnis konnte bei Wiederholung des Experimentes bestätigt werden.

Zusammenfassend ergibt sich aufgrund der phänotypischen Analyse der *las-4/axr1-12*-Doppelmutanten, dass *las-4* in Achseln der älteren Rosettenblätter in Bezug auf die Anlage von Achselmeristemen epistatisch über *axr1-12* wirkt. Da aber *axr1-12/las-4*-Doppelmutanten im Vergleich zu *las-4*-Einzelmutanten tendenziell aus einer größeren Zahl der oberen Rosettenblätter Seitentriebe produzieren, hat *axr1-12* offensichtlich einen Einfluss auf den Bereich, in dem sich die *las-4*-Mutation phänotypisch auswirken kann.

3.1.2.3 In *axr1-12/las-4*-Doppelmutanten ist die Bildung akzessorischer Seitentriebe unterdrückt

Bei eingehender Untersuchung des veränderten Verzweigungsmusters von *axr1-12*-Mutanten, wurde ein weiterer Aspekt in die phänotypische Analyse mit einbezogen. Wie in Abbildung 3.2.A gezeigt, bilden *axr1-12*-Pflanzen akzessorische Seitentriebe. Diese Triebe bilden sich mit zeitlicher Verzögerung gegenüber dem Auswachsen des primären Seitentriebs zwischen dessen abaxialer Basis und der adaxialen Basis eines Stängelblattes. Dieses Phänomen tritt

auch bei Columbia-Pflanzen auf, allerdings nur in seltenen Einzelfällen. Im Gegensatz dazu bilden *axr1-12*-Mutanten diese zusätzlichen Seitentriebe aus den meisten Blattachseln von Stängelblättern. Bei erster Begutachtung von *axr1-12/las-4*-Doppelmutanten konnte dies nur in wenigen Blattachseln von Stängelblättern festgestellt werden. Deshalb wurde dieser Aspekt, wie im Folgenden beschrieben, eingehender untersucht.

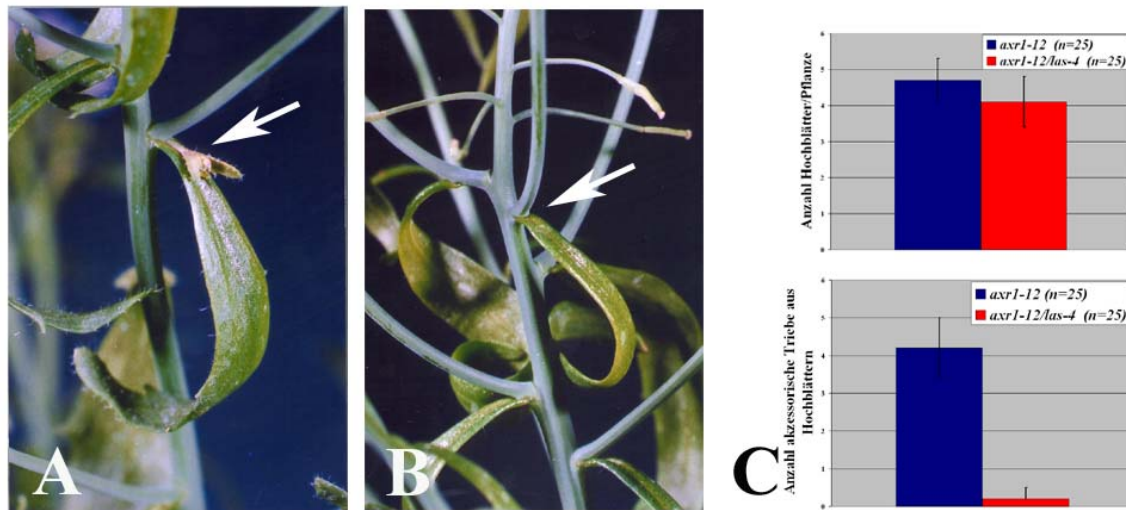


Abb. 3.2.: Bildung akzessorischer Seitentriebe aus Blattachseln von Stängelblättern in *axr1-12* (A) und *axr1-12/las-4* (B) Mutanten. Die Pfeile markieren den Bereich zwischen primärem Trieb und adaxialer Blattbasis aus dem in *axr1-12* (A) ein akzessorischer Trieb gewachsen ist, B zeigt eine *axr1-12/las-4* Pflanze ohne akzessorischen Seitentrieb. C: zeigt ein Balkendiagramm mit einem Vergleich zwischen *axr1-12* und *axr1-12/las-4* Mutanten wobei die Anzahl gebildeter Stängelblättern (oben) und die Anzahl gebildeter akzessorischer Triebe pro Pflanze nach Entfernen des primären Seitentriebs (unten) bestimmt wurde. Weitere Beschreibung im Text.

So wurde bei blühenden *axr1-12*- und *axr1-12/las-4*-Pflanzen die Zahl der Stängelblätter bestimmt und anschließend die primären Seitentriebe aus Stängelblättern etwa 2-3 cm von der Basis entfernt abgeschnitten. Nach 10 Tagen wurde die Zahl der ausgewachsenen akzessorischen Triebe pro Pflanze erfasst. Das Diagramm in Abbildung 3.2.C (oben) zeigt die bei *axr1-12* durchschnittlich gebildete Anzahl an Stängelblättern (blaue Balken). Ein Vergleich mit Abbildung 3.2.C (unten), in dem die durchschnittliche Anzahl akzessorischer Triebe pro Pflanze ausgezählt wurde (wobei jeweils nur jeweils 1 akzessorischer Trieb pro Blattachsel beobachtet wurde) verdeutlicht, dass die meisten Stängelblätter akzessorische Seitentriebe bildeten. Es wurden aus durchschnittlich 4,7 Stängelblättern (89%) eine durchschnittliche Zahl von 4,2 akzessorischen Seitentrieben gebildet. Im Gegensatz dazu bildeten *axr1-12/las-4*-Doppelmutanten bei nur leicht geringerer Anzahl an Stängelblättern (Ø 4,1) nur durchschnittlich 0,2 (5%) akzessorische Seitentriebe.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass *las-4* die Bildung akzessorischer Seitentriebe in *axr1-12* unterdrückt.

3.1.3 Charakterisierung von *las-4/ max1-1*-Doppelmutanten

Neben der oben beschriebenen *axr1-12*-Mutante sind noch verschiedene andere Mutanten, die zu einem verstärkten Austreiben von Seitentrieben führen, charakterisiert worden. Eine Gruppe von Mutanten, die in der Arbeitsgruppe von O. Leyser isoliert und charakterisiert wurden, sind die *more axillary growth-(max)* Mutanten. *max1-1* und *max2-1* zeigen ein verstärktes Austreiben der Achselknospen in der Rosette. Beide Mutationen führen außerdem zu einem verkürztem Haupttrieb und veränderter Blattform (Stirnberg et al. 2002). Die Mutanten wurden uns im Rahmen einer Kollaboration mit O. Leyser freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das *MAX1*-Gen ist noch nicht kloniert worden, es wurde aber bereits eine grobe Kartenposition ermittelt, es befindet sich auf Chromosom 2 eng gekoppelt mit dem Marker ER (Stirnberg et al. 2002), ist also nicht mit *LAS* (Chromosom1) gekoppelt.

Die Kreuzung wurde wie in Abschnitt 2.2.4.1 angegeben durchgeführt.

Keimungsrate	Wildtyp	<i>max1-1</i>	<i>las-4</i>	<i>max1-1/las-4</i>
93 % 65 von 70 gekeimt (Erwartung)	36 (36,6)	17 (12,2)	10 (12,2)	2 (4,0625)

Tabelle 3.2. Phänotypische Auswertung der F₂-Generation der Kreuzung *max1-1/las-4*. Die Werte der theoretischen Segregation beziehen sich auf die erwartete 9 : 3 : 3 : 1 (Wt : Phänotyp 1 : Phänotyp 2 : Doppelmutante) bezogen auf die Zahl der tatsächlich gekeimten Pflanzen. Weitere Angaben im Text.

Das Ergebnis der phänotypischen Charakterisierung der F₂-Generation ist in Tabelle 3.2 aufgeführt. Es wurden 4 Gruppen von Phänotypen identifiziert. 36 Pflanzen waren wildtypisch, 10 Pflanzen zeigten die *las-4* Charakteristika, 17 Pflanzen *max1-1*-Blattform und Verzweigungsmuster sowie 2 Pflanzen *max1-1*-Blattform und Größe, aber keine Seitentriebe aus der Rosette. Da 4 Phänotypgruppen vertreten sind, ist unwahrscheinlich, dass die Keimungsrate von 93% Folge des Aufspaltens eines letalen Phänotyps ist. Ebenso sind die

leichten Abweichungen der Werte von *max1-1*, *las-4* und der Doppelmutanten eher durch die relativ kleine F₂-Population zu erklären. Wie in Abbildung 3.3. A anhand der Habitusaufnahmen von *max1-1* (links) und *max1-1/las-4* zu erkennen ist, gleichen die Doppelmutanten in Gesamtgröße und Blattform den *max1-1*-Mutanten. Anhand der Großaufnahmen der Blattrosetten einer *max1-1*- (Abb.3.3.C) und einer *max1-1/las-4*-Mutante (Abb.3.3.B) kann man erkennen, dass *max1-1* ein starkes Auswachsen der Achseltriebe aus der Rosette aufweist, wohingegen die Doppelmutante keine Seitentriebe aus der Rosette bildet. Auch hier wurde, wie bereits in Abschnitt 3.1.2.2.. beschrieben, ein Dekapitierungsexperiment durchgeführt. Zum Zeitpunkt des Öffnens der ersten Blüten wurde der Haupttrieb oberhalb der Rosette entfernt. Nach 10 Tagen wurde die Anzahl der ausgewachsenen Triebe (>0,5 cm) aus der Rosette bestimmt. Das Diagramm 3.3.D stellt den Vergleich von Columbia, *max1-1* und *las-4* dar. In Wildtyp-Pflanzen wurden zwischen 5 und 10 Triebe gezählt, wobei ein Schwerpunkt bei 7 bis 8 Trieben lag, in *max1-1*-Pflanzen hingegen wurden 9 bis 15 Triebe ermittelt. Ein Schwerpunkt lag hier bei 10 bis 13 Trieben pro Pflanze. Dies ist im Einklang mit Stirnberg et al. (2002), die zeigen konnten, dass in *max1-1* mehr Achselknospen aus der Rosette auswachsen als im Wildtyp.

Des weiteren zeigt Diagramm 3.3.D die ermittelten Daten für *las-4*. Dabei wurden für *las-4* keine bis 3 Seitentriebe gezählt, die meisten Pflanzen zeigten 1 Trieb. Die in der Rosette von *las-4*-Mutanten produzierten Triebe wurden ausschließlich in den Blattachseln der jüngsten (obersten) Rosettenblätter beobachtet. Diagramm 3.3.E zeigt die bereits in 3.3.D beschriebenen Werte von *max1-1*- und die von *max1-1/las-4*-Doppelmutanten. Letztere bilden zwischen 0 und 2 Seitentriebe, wobei ein Schwerpunkt bei 0-1 Seitentrieben liegt. Die Doppelmutanten unterscheiden sich in diesem Aspekt also deutlich von *max1-1*-Pflanzen. *max1-1/las-4*-Pflanzen bilden sogar tendenziell etwas weniger Triebe.

Das Experiment wurde mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *las-4* die Seitentriebbildung aus Rosettenblättern von *max1-1*-Pflanzen unterdrückt, also diesbezüglich epistatisch über *max1-1* wirkt.

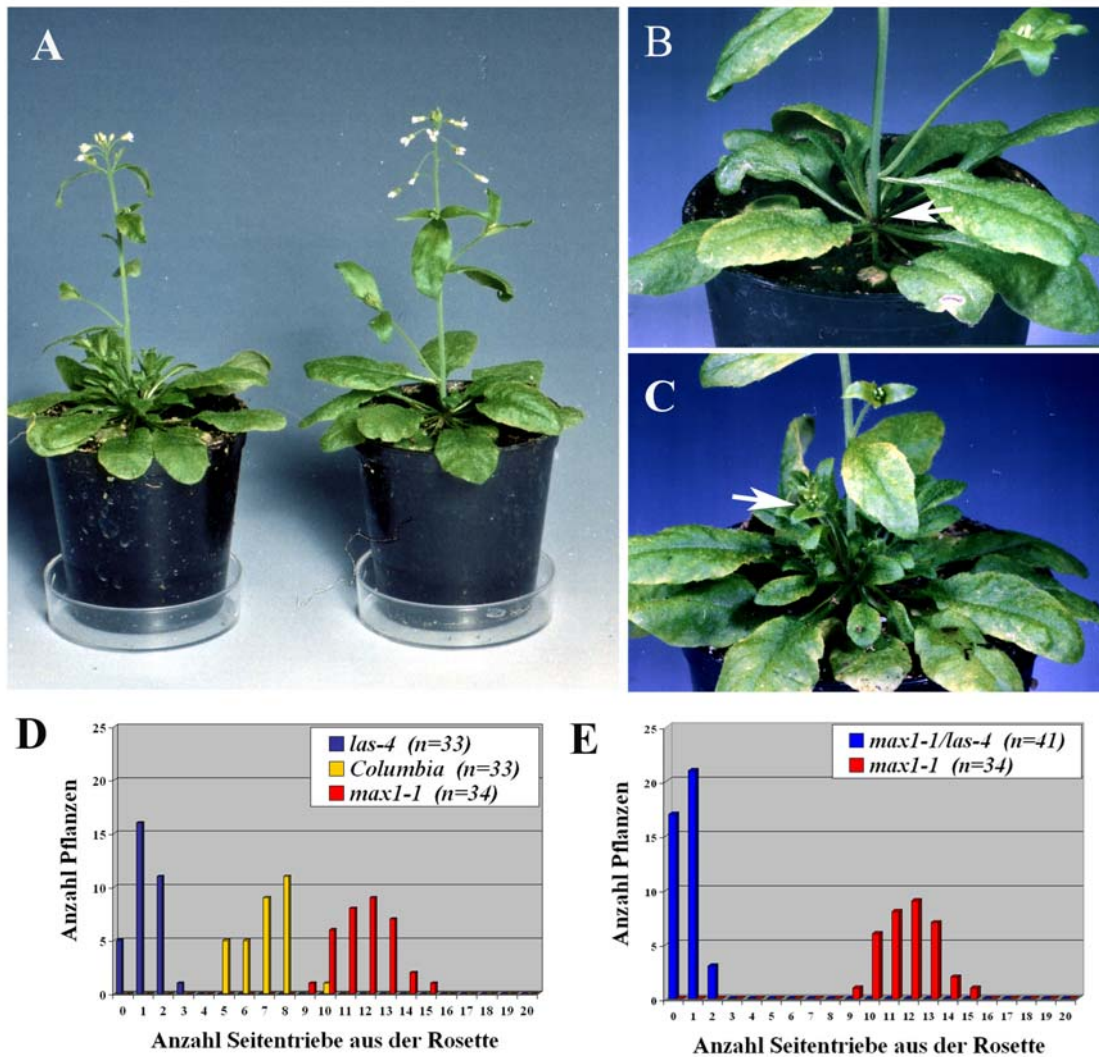


Abb. 3.3.: Beschreibung des Phänotyps von *max1-1* (A l.,C) und *max1-1/las-4* -Mutanten (A r., B). **A:** Habitusaufnahmen von *max1-1* (links) und *max1-1/las-4* (rechts). Beide Pflanzen sind kleiner gewachsen als Wildtyp-Pflanzen und haben eine veränderte Blattform. Die Nahaufnahme in C verdeutlicht, dass *max1-1* sich durch verstärktes Austreiben von Seitentrieben aus der Rosette auszeichnet, der Pfeil weist auf die Infloreszenz eines Triebes aus der Rosette hin. **B** zeigt die Nahaufnahme der Rosette einer *max1-1/las-4*-Mutante, die keine Seitentriebe aus Rosettenblättern bildet. Der Pfeil markiert eine leere Blattachsel. **D-E:** Dekapitierungsexperiment, der Hauptsproß wurde beim Öffnen der ersten Blüten oberhalb der Rosette entfernt. Die Zahl der aus der Rosette gewachsenen sekundären Triebe wurde nach 10 Tagen bestimmt. Die Diagramme zeigen Columbia- (D), *las-4*- (D), *max1-1*- (D,E) sowie *max1-1/las-4* -Pflanzen (E).

3.1.4 Charakterisierung von *las-4/max2-1*-Doppelmutanten

Wie bereits in Abschnitt 3.1.3. erwähnt, ist in *max*-Mutanten das Auswachsen der Achselknospen von Rosettenblättern dereprimiert. Bei *max2-1* handelt es sich um eine Mutation in einem F-Box Protein, das bereits von einer anderen Arbeitsgruppe als *ORE9* und als möglicher Regulator von Blattseneszenz beschrieben wurde (Woo et al., 2001). *max2-1* führt bei mit Licht angezogenen Keimlingen zu einem verlängertem Hypokotyl und

verlängerten Petiolen (Stirnberg et al., 2002). *max2* ist nicht allelisch zu *max1*, es befindet sich aber ebenfalls auf Chromosom 2, ist also ebenfalls nicht gekoppelt mit *LAS*.

Die Kreuzung wurde gemäß Abschnitt 2.2.4.1. durchgeführt.

Keimungsrate	Wildtyp	<i>las-4</i>	<i>max2-1</i>	<i>max2-1/las-4</i>
94 % (99 von 105 gekeimt)	48	17	19	5
(Erwartung)	(55,7)	(18,6)	(18,6)	(6,2)

Tabelle 3.3. Phänotypische Auswertung der F₂-Generation der Kreuzung von *max2-1* und *las-4*. Von den Phänotypenanalysen sowie der errechneten Segregationsrate wurden 10 Pflanzen ausgeschlossen, die aufgrund Insektenbefalls ein gestörtes Wachstum zeigten. Die Werte der theoretischen Segregation beziehen sich auf die erwartete 9 : 3 : 3 : 1 (Wt : Phänotyp 1 : Phänotyp 2 : Doppelmutante) bezogen auf die Zahl der tatsächlich in die Analyse einbezogenen Pflanzen.

Die phänotypische Charakterisierung der F₂-Generation (Tabelle 3.3.) zeigte etwa 10 Pflanzen, die sich durch ein abnormales Wachstum auszeichneten. Die Pflanzen zeigten gestörtes Wachstum aus der Rosette, was zu einem *wuschel*-ähnlichen Phänotyp führte. Beim Vergleich mit den Kontrollpflanzen und anderen Pflanzen im Gewächshaus, die in unabhängigen Linien ähnliche Phänotypen zeigten, stellte sich heraus, dass dies durch Insektenbefall im Gewächshaus ausgelöst wurde. Diese Pflanzen wurden daher nicht in die Analyse mit einbezogen.

Des Weiteren wurden 4 phänotypische Gruppen unterschieden: 48 Pflanzen zeigten einen Wildtyp Phänotyp, 17 Pflanzen einen *las-4*-Phänotyp, 19 einen *max2*-Phänotyp und 5 Pflanzen zeigten Blatt und Größenmerkmale von *max2-1*-Kontrollpflanzen zusammen mit dem Verzweigungsphänotyp von *las-4*. Die ermittelte Aufspaltung der Phänotypen stimmt mit einer 9:3:3:1 Segregation überein (wt : *las-4* : *max2-1* : *max2-1/las-4*), sie weicht nur leicht für die mit 89 charakterisierten Pflanzen rechnerisch erwartete von (50 : 17 : 17 : 6) ab. Abbildung 3.4. zeigt die weitere Charakterisierung der Mutanten.

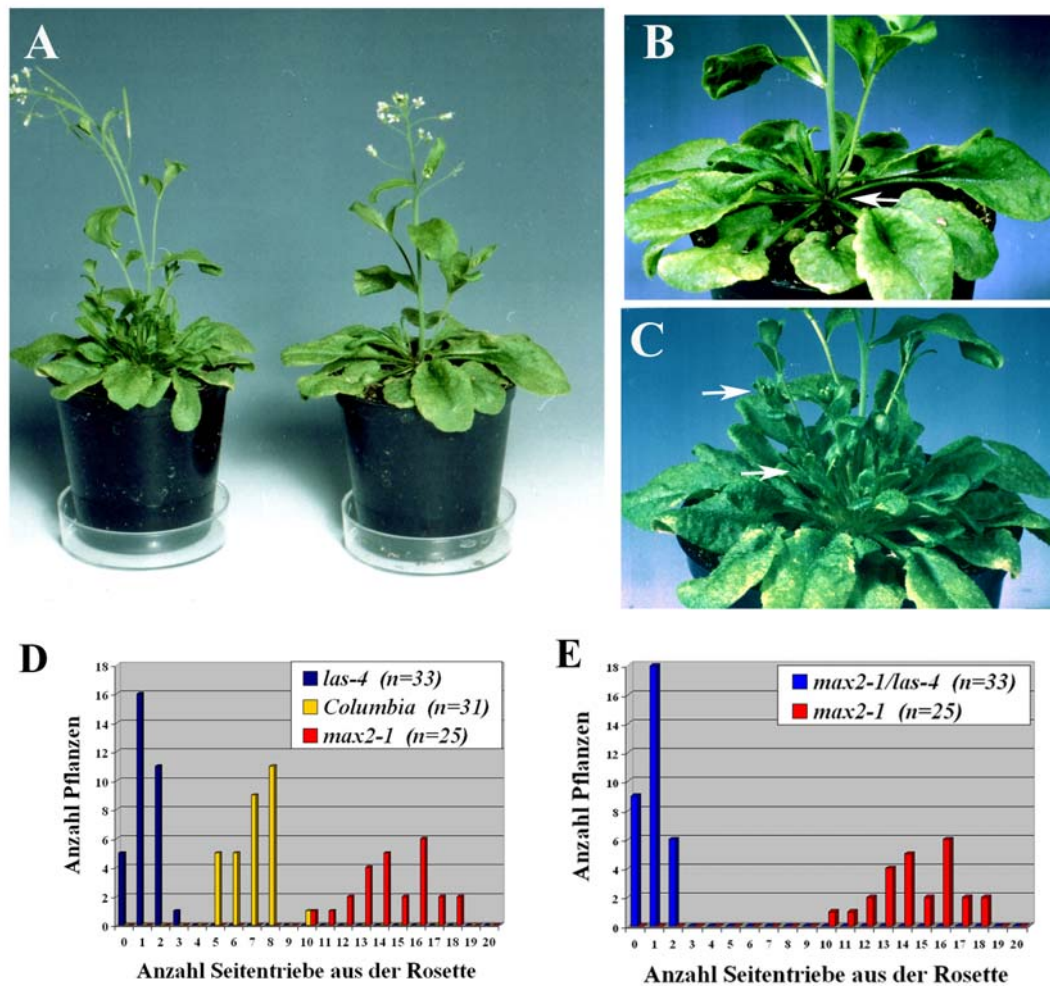


Abb. 3.4.: Phänotypische Charakterisierung von *max2-1* und *max2-1/las-4*. **A** zeigt Habitusaufnahmen von *max2-1* (links) und *max2-1/las-4* (rechts). Die reduzierte Gesamtgröße und die veränderte Blattform sind ähnlich, *max2-1* weist ein verstärktes Austreiben der Achselknospen auf, *max2-1/las-4* bildet keine Seitentriebe aus der Rosette. **B:** Nahaufnahme einer Rosette von *max2-1/las-4* ohne Seitentriebe, der Pfeil markiert eine leere Blattachsel. **C:** Nahaufnahme *max2-1* Rosette mit vielen austreibenden Seitensprossen. Die Pfeile markieren die Infloreszenzen von Seitentrieben aus der Rosette. **D-E:** Dekapitierungsexperiment: der Hauptsproß wurde beim Öffnen der ersten Blüten oberhalb der Rosette entfernt. Nach 10 Tagen wurde die Zahl der aus der Rosette gewachsenen sekundären Triebe ermittelt. Die Diagramme zeigen *Columbia* -(D), *las-4* -(D), *max2-1* -(D,E) sowie *max2-1/las-4* -(E) Pflanzen. Weitere Informationen im Text.

Wie in Abbildung 3.4.A ersichtlich, haben *max2-1* (links) und *max2-1/las-4* (rechts) die veränderte Blattform und reduzierte Größe des Hauptsprosses gemeinsam. Während das verstärkte Austreiben der Seitensprosse aus der Rosette *max2-1* ein buschiges Erscheinungsbild verleihen, ist dies in *max2-1/las-4* nicht zu beobachten. Dies verdeutlicht die Nahaufnahme der Rosette von *max2-1* (Abb. 3.4.C). Die Rosette von *max2-1/las-4* (Abb. 3.4. B) zeigt hingegen keine Bildung von Lateralsprossen, der Pfeil markiert eine leere Blattachsel in der Rosette. Zur genaueren Untersuchung des Phänotyps wurden wie bereits beschrieben (Abschnitt 3.1.2.2.) Dekapitierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die

Ergebnisse der homozygoten Doppelmutanten und der in Abb. 3.4.D und E beschriebenen Kontrollpflanzen verglichen und analysiert. Diagramm 3.4.D zeigt das Resultat für Columbia, *las-4*- und *max2-1*-Pflanzen. Da die Experimente für *max1-1* und *max2-1* parallel durchgeführt worden, sind *las-4*- und Col-Kontrollen identisch in Abschnitt 3.1.3. und bereits dort beschrieben.

Bei den untersuchten *max2-1*-Mutanten konnten 10 bis 18 Seitentriebe beobachtet werden, also deutlich mehr als bei den Col-Pflanzen.

Wie in Diagramm 3.4.E dargestellt, bildeten *max2-1/las-4*-Doppelmutanten zwischen null und 2 Seitentriebe aus der Rosette, also deutlich weniger als die für *max2-1* ermittelten 10-18. Alle in Doppelmutanten festgestellten Triebe wuchsen, wie schon bei *las-4* beobachtet, aus Achseln der oberen Rosettenblätter. Der Vergleich zeigt, dass die Doppelmutanten tendenziell sogar noch weniger Seitentriebe bildeten als *las-4*-Einzelmutanten.

Die dargestellten Werte wurden bei einer Wiederholung des Experimentes bestätigt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass *las-4* in Bezug auf Seitentriebentwicklung aus der Rosette epistatisch über *max2-1* wirkt.

3.1.5 Charakterisierung von *las-4/rev-5*-Doppelmutanten

Neben *las-4* gibt es noch verschiedene andere Mutanten, die zu einer Unterdrückung der Seitentriebentwicklung führen. Ein gut charakterisiertes Gen ist *REVOLUTA*: bei Funktionsverlust bilden Pflanzen keine Lateralmeristeme während vegetativer und generativer Wachstumsphase, ebenso ist die Anlage von Blüten oftmals gestört (Talbert et al., 1995; Otsuga et al., 2001; Zhong und Ye, 2001) Um auf genetischem Wege zu überprüfen, ob *LAS* und *REV* in gleichen oder verschiedenen genetischen Signaltransduktionswegen agieren, wurden Doppelmutanten aus *las-4* und *rev-5* etabliert. Gehörten sie beispielsweise redundanten Stoffwechselwegen an, die die Anlage von Lateralmeristemen aktivieren, sollte eine Kombination beider Mutationen zu einem deutlich stärkeren Phänotyp führen.

Für die Herstellung der Doppelmutanten wurde das *rev-5*-Allel verwendet, das einen starken Phänotyp hat und sich wie *las-4* in einem Columbia Hintergrund befindet. Anzumerken ist, dass bei wiederholtem Auslegen der selben *rev-5*-Linie eine Variabilität des Phänotyps festgestellt wurde. Bei *rev-5*-Mutanten ist in den meisten Fällen die Seitentriebbildung in allen Blattachsen unterdrückt, andererseits wurden auch Pflanzen identifiziert, die nur wenige leere Blattachsen aufwiesen und nur einen schwachen Phänotyp in der Infloreszenz zeigten.

Da dieser Effekt auch bei Charakterisierung des *rev-1*-Allels gesehen wurde, ist eine Abhängigkeit des Phänotyps von Umweltbedingungen möglich. Generell erschien der Phänotyp in den heißeren Sommermonaten schwächer als in Wintermonaten.

Die Kreuzung wurde gemäß 2.2.4.1. durchgeführt. In der F₂-Generation wurden 70 Pflanzen analysiert. Es wurden 3 Gruppen von Pflanzen festgestellt: wildtypische, starke *rev-5*-Pflanzen (Abb. 3.5.A, B, C), *las-4*, allerdings auch zahlreiche Pflanzen mit einem intermediären Erscheinungsbild. Bei der phänotypischen Charakterisierung trat offensichtlich das Problem auf, dass schwache *rev-5*-Phänotypen und *las-4*-Phänotypen schlecht voneinander zu unterscheiden waren. Aus diesem Grund wurden mehrere Pflanzen molekular mit dem *las-4* spezifischen CAPS Marker mTest_*las-4* und einem weiteren CAPS Marker, der das *rev-5* Allel erkennt (mTest_*rev-5*) getestet. Für die weitere Analyse wurde je 1 Pflanze ausgewählt, die genotypisch *las-4/las-4 REV/rev-5* war bzw. *LAS/las-4 rev-5/rev-5*. Die Nachkommenschaft der ersten Linie war also durchweg homozygot für *las-4*, *rev-5* dagegen spaltete auf. Alle Pflanzen wurden erneut mit dem *rev-5* spezifischen CAPS Marker charakterisiert. Dabei wurden 21 Pflanzen gefunden, die *REV/REV* bzw. *REV/rev-5* waren. Bei Abgleich mit den Phänotypen der Pflanzen korrelierte dies mit dem *las-4*-Phänotyp. Außerdem fanden sich 13 Pflanzen, die homozygot *rev-5* waren und auch durchweg einen stärkeren Phänotyp als *las-4* zeigten (Abb. 3.5.E). Teilweise zeigten die Pflanzen allerdings nur ein *las-4*-Verzweigungsmuster (Abb. 3.5.F), wiesen aber mehrfach defekte Blütenbildung auf. Die Abweichung von einer 3:1 Segregation ist womöglich durch die relativ geringe Zahl Pflanzen in der Analyse zu erklären.

Die zweite Linie zeigte wie erwartet durchweg einen *rev-5*-Phänotyp. Die molekulare Analyse mit dem *las-4*-CAPS Marker ergab 26 Pflanzen, die *LAS/LAS* oder *LAS/las-4* waren und 6 Pflanzen die homozygot für *las-4* waren. Die Abweichung vom 3:1 Phänotyp ist wie bei Linie 1 durch geringe Anzahl analysierter Pflanzen zu erklären.

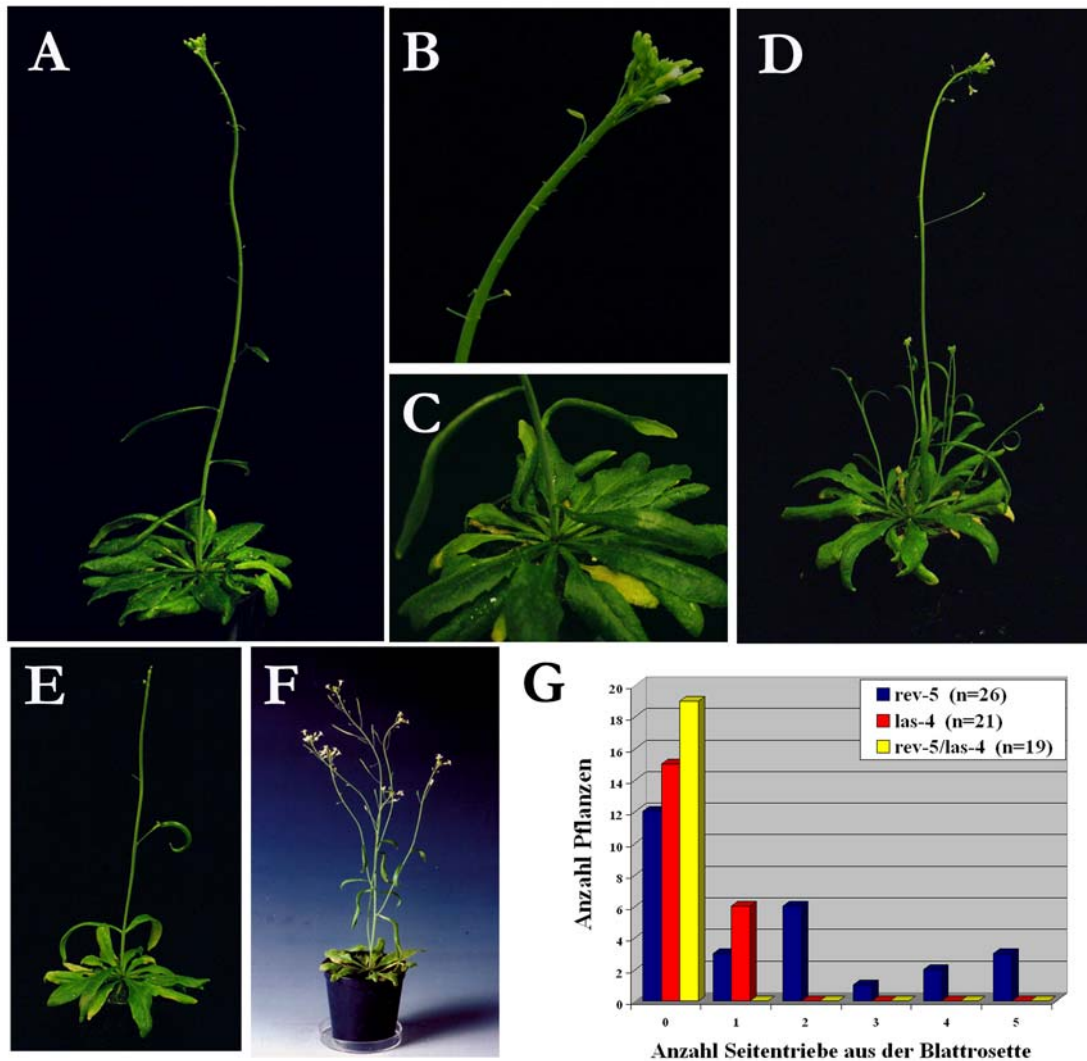


Abb. 3.5.: Charakterisierung von *rev-5*- (A-D) und *rev-5/las-4*-Pflanzen (E,F). A zeigt den Habitus einer *rev-5*-Pflanze mit starkem Phänotyp die keine Seitentriebe bildet und teilweise defekte Blütenbildung aufweist. B: Nahaufnahme der Infloreszenz und C der Blattrosette. In D ist der Habitus einer *rev-5*-Pflanze mit schwächerem Phänotyp abgebildet. Zu sehen sind Seitentriebe, die aus der Rosette auswachsen. Des weiteren sind *rev-5/las-4*-Pflanzen mit starkem (E) und schwachem (F) Phänotyp zu sehen. Das Diagramm (G) zeigt die Menge der Seitentriebe aus der Rosette in den Mutanten. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Bei der Charakterisierung der segregierenden Populationen fiel auf, dass nie ein Phänotyp entdeckt wurde, der stärker als der von *rev-5* war. Wie bereits erwähnt, variiert der *rev-5* Phänotyp leicht. Dabei kommt es unter anderem auch zur Seitensprossentwicklung aus der Blattrosette. Das Diagramm in Abbildung 3.5.G zeigt die Menge an Seitentrieben, die aus Rosettenblättern der Nachkommen von Linie 1 und 2 auswuchsen jeweils den genotypischen Gruppen zugeordnet. Die Doppelmutanten aus beiden Linien wurden dabei zusammengezählt. Zu sehen ist eine Variabilität in Bezug auf die Seitentriebbildung aus der Rosette bei *rev-5*-Mutanten. Obwohl der größte Teil der *rev-5*-Pflanzen keine Seitentriebe bildete, wurden bei anderen bis zu 5 gezählt. Der größte Teil der *las-4*-Pflanzen bildete keine Achseltriebe, der

restliche Teil bildete einen Trieb. Alle analysierten Doppelmutanten dagegen bildeten keinen Trieb aus der Rosette. Damit wird deutlich, dass *las-4* diesbezüglich zumindest die Variabilität des *rev-5*-Phänotyps unterdrückt und der Doppelmutantenphänotyp stärker als der *las-4*-Phänotyp ist.

Generell ist nach diesen Untersuchungen zu bemerken, dass durch Kombination von *las-4* und *rev-5* kein Phänotyp entsteht, der stärker ist als der *rev-5*-Phänotyp. Anzumerken ist, dass *las-4* in der Blattrosette die Variabilität des *rev-5*-Phänotyps unterdrückt und *rev-5* den *las-4*-Phänotyp verstärkt. Da beide Mutationen unter anderem zur Unterdrückung der Bildung von Achselmeristemen in der Rosette führen, ist aus dieser Untersuchung nicht abzuleiten, welches der Gene dort früher wirkt.

3.1.6 Charakterisierung von *stm-2/las-4*-Doppelmutanten

Das *SHOOT MERISTEMLESS*-Gen ist in Meristemen, aber nicht in Organprimordien exprimiert und ist für die Aufrechterhaltung der meristematischen Aktivität der Zellen nötig. Funktionsverluste im STM-Protein führen in starken Fällen (*stm-1*) dazu, dass sich kein SAM während der Embryogenese an der Basis der Kotyledonen etablieren kann (Long et al., 1996). Schwächere mutante Allele wie *stm-2* führen in den meisten Fällen zu einer Art „Stop-and-go“-Wachstum. Das äußert sich darin, dass sich Meristeme zwar oftmals an der Blattbasis etablieren und wenige Organe bilden, anschließend aber ihr meristematisches Potenzial wieder verlieren und das Wachstum einstellen. An der Basis der neu gebildeten Blätter können sich dann wiederum neue Meristeme etablieren, die kurzzeitig aktiv sind. Dieser Vorgang wiederholt sich und führt so zu einem ungeordneten Wachstum der Pflanzen und zu einem buschigen Erscheinungsbild von *stm-2*-Pflanzen. Des Weiteren ist zu bemerken, dass die gebildeten Blüten zumeist keine inneren Blütenorgane anlegen und somit nicht fertil sind. Otsuga et al. (2001) konnten zeigen, dass die *rev-6*-Mutation die Ausprägung der *stm-2*-Mutation moduliert. Dabei war in *rev-6/stm-2*-Pflanzen öfter als in *stm-2* die postembryonale Organogenese unterdrückt. Da *revoluta-6* die Anlage von Seitentrieben unterdrückt, liegt der Schluss nahe, dass die in *stm-2* postembryonal gebildeten Meristeme den Charakter von Achselmeristemen haben. Da *las-4* ebenfalls die Seitentriebentwicklung in der vegetativen Wachstumsphase unterdrückt, wurde eine Doppelmutantenanalyse durchgeführt um zu überprüfen, ob *las-4* einen ähnlichen Effekt auf *stm-2* ausübt.

Die Kreuzung wurde wie in Abschnitt 2.2.4.1. angegeben durchgeführt. Da homozygote *stm-2* Pflanzen keine Stamen und Carpelle bilden, wurden heterozygote Pflanzen für die Kreuzung verwendet.

Für die eigentliche Charakterisierung von *stm-2/las-4*-Doppelmutanten sollten Linien etabliert werden, die homozygot für *las-4* sind, aber für *stm-2* aufspalten. Zu diesem Zweck wurden aus der F₂-Generation Pflanzen mit *las-4*-Phänotyp ausgewählt und abgeerntet. In der F₃-Generation wurde phänotypisch auf die Anwesenheit des *stm-2*-Allels geprüft. Von 6 begutachteten Linien spaltete lediglich eine für *stm-2* auf, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass beide Loci auf Chromosom 1 liegen und eine relativ hohe Kopplung aufweisen.

Zur weiteren Analyse des Phänotyps wurde diese Linie verwendet. In Abbildung 3.6. wird der Phänotyp von *stm-2*- und *stm-2/las-4*-Mutanten näher erläutert. Wie in Abbildung 3.6.A zu sehen, ist in *stm-2*-Mutanten die Bildung eines Meristems an der Basis der Keimblätter stark verzögert. Der Vergleich mit einer Wildtyp-Pflanze (Abb. 3.6.C) zeigt, dass diese im gleichen Stadium bereits mehrere Folgeblätter gebildet hat. Abbildung 3.6.B zeigt in Grossaufnahme die Basis der Keimblätter einer *stm-2*-Pflanze. Der Pfeil markiert ein sich neu bildendes Meristem, das im Vergleich zum Wildtyp stark verzögert entsteht. In *stm-2/las-4*-Pflanzen (Abb. 3.6. D-F) ist wie in *stm-2* die Bildung eines Meristems stark verzögert. Abb.3.6. A zeigt einen Keimling, der noch kein Meristem gebildet hat. Abbildung 3.6. E zeigt einen Keimling, bei dem zwei stark fusionierte Blätter aus der Basis der Keimblätter wachsen. In der Nahaufnahme dieses Blattes (Abb.3.6.F) ist zu erkennen, dass vor allem die Petiolen der Blätter stark fusioniert sind.

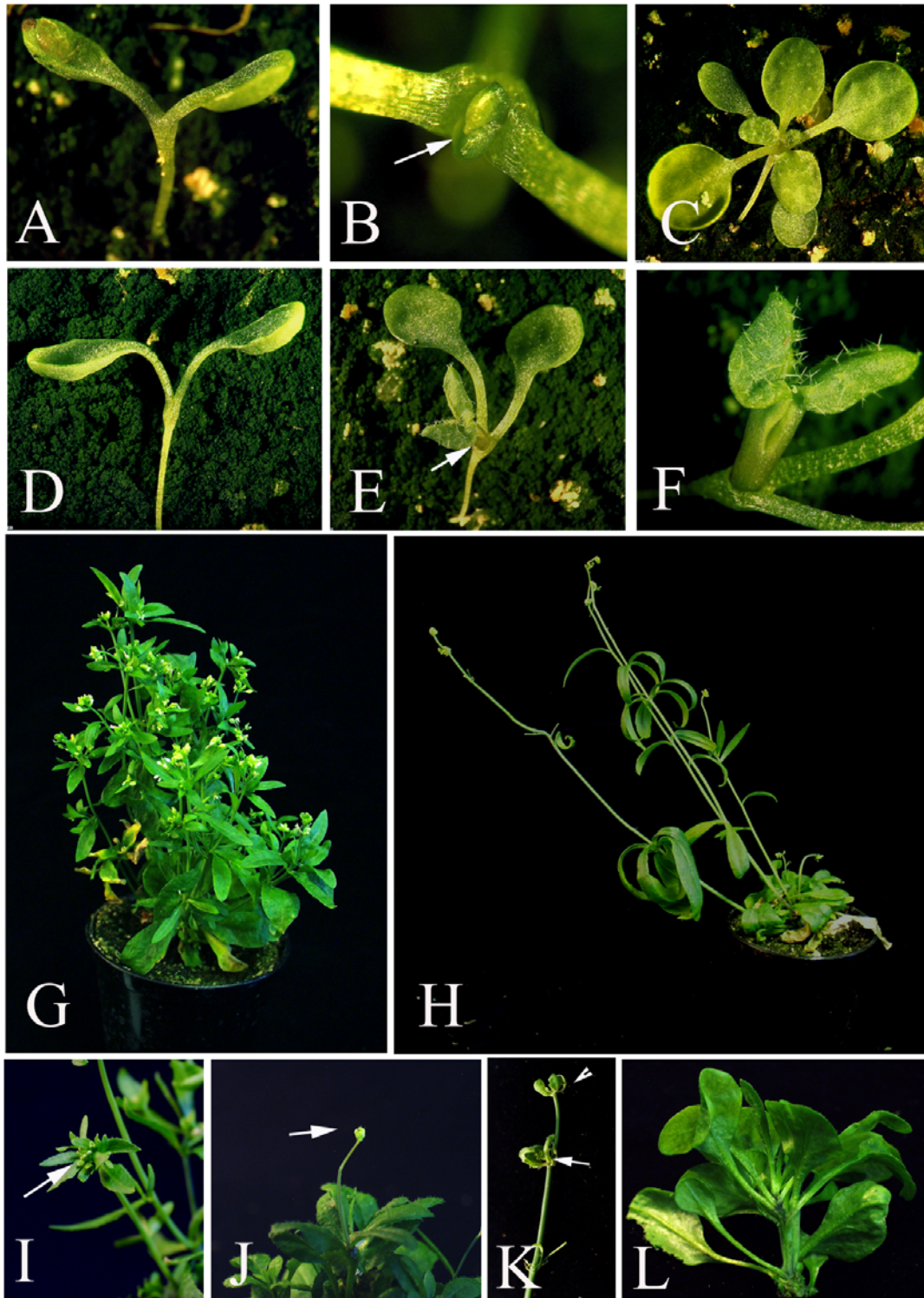


Abbildung 3.6.:Phänotypische Charakterisierung von *stm-2* (A,B,G,I), *stm-2/las-4* (D,E,F,H,J,K,L) und Wt (C). A: *stm-2*-Keimling, der zunächst nur die Keimblätter bildet, B: Nahaufnahme der Basis der Cotyledonen, mit einem formierendem Meristem. D: Ein *stm-2/las-4*-Keimling, der ebenfalls nur Keimblätter bildet. E: In E ist eine Doppelmutante gezeigt, aus deren Basis der Cotyledonen Blätter mit fusionierten Petiolen auswachsen. F :Eine Nahaufnahme der Blätter. Zum Vergleich ist in C eine Wildtyp-Pflanze des gleichen Alters abgebildet. In G ist der Habitus einer älteren *stm-2*-Pflanze abgebildet, in H zum Vergleich eine *stm-2/las-4*-Pflanze. I: Die Infloreszenz einer *stm-2*-Pflanze. Infloreszenzen mit einzelnen Blüten entstanden in Doppelmutanten (J), die aber oft florale Reversion zeigten (K). Wie schon im Keimlingsstadium zu sehen, bilden *stm-2/las-4*-Pflanzen stark fusionierte Blütenstiele. In L ist ein Spross einer *stm-2/las-4*-Mutante mit stark fusionierten Petiolen zu sehen. Weitere Informationen im Text.

Um genauer zu analysieren, ob *las-4* das frühe *Stop-and-go*-Wachstum von *stm-2* beeinflusst, wurde die frühe postembryonale Entwicklung von *stm-2*- und *stm-2/las-4*-Mutanten untersucht. Tabelle 3.5. fasst die Ergebnisse zusammen.

	Wachstumsstop	
63 <i>stm-2/las-4</i>	6	9,5%
58 <i>stm-2</i>	9	15,5 %

Tabelle 3.5. Phänotypische Analyse der frühen postembryonalen Entwicklung von *stm-2* und *stm-2/las-4* Mutanten. In der Tabelle sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten Zusammengefasst.

In zwei unabhängigen Experimenten wurden 255 Nachkommen der *las-4/las-4 STM/stm-2*-Pflanze analysiert. Insgesamt wurden 180 *las-4*-Pflanzen und 63 *stm-2/las-4*-Phänotypen identifiziert. Von den 63 *stm-2/las-4*-Pflanzen bildeten 6 (9,5%) keine neuen Meristeme aus der Basis der Kotyledonen. Die Analyse einer für *stm-2* segregierenden Population resultierte in 155 Wildtypen und 58 *stm-2*-Pflanzen, von denen 9 (15,5 %) keine weitere postembryonale Organogenese zeigten. In diesem Aspekt unterscheidet sich offenbar der Einfluss von *rev-6* und *las-4* auf *stm-2*. Während *rev-6* den frühen *stm-2*-Phänotyp verstärkt, hat *las-4* keinen Einfluss darauf. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass *rev-6* einen stärkeren Verzweigungsphänotyp hat, und die Achselmeristementwicklung in allen Blattachsen unterdrückt, *las-4* dagegen nur in der vegetativen Wachstumsphase. Dabei ist aber noch zu betonen, dass diese frühe Entwicklungsphase der Pflanzen unter Kurztagbedingungen stattgefunden hat, die Pflanzen also noch keine Blühinduktion durchlaufen haben.

Deutlich unterscheiden sich ältere *stm-2*- und *stm-2/las-4*-Pflanzen voneinander. In Abbildung 3.6.G wird die Habitusaufnahme einer *stm-2* Mutante gezeigt. Die Pflanzen sind kleiner und buschiger als Wildtyp-Pflanzen. In Abb. 3.6.I markiert der Pfeil die Infloreszenz einer *stm-2*-Pflanze, die aus mehreren Blüten besteht, aber keine Streckung der Internodien zeigt. Die *stm-2/las-4*-Pflanzen hingegen sind weniger buschig und werden größer (Habitus Abb. 3.6.H). Wie in Abbildung 3.6.J zu sehen, besteht die Infloreszenz häufig nur aus einer Blüte (Pfeil). Eine häufige Beobachtung war florale Reversion (Abb. 3.6.K). Dies äußert sich dadurch, dass die Blüte zunächst Sepalen bildet (Pfeil), dann aber wieder eine Streckung der Internodien stattfindet und ein neuer Wirtel Sepalen (Pfeilspitze) gebildet wird. Während schon *stm-2*-Einzelmutanten eine schwache Tendenz zu Fusionen der Basis von Petiolen zeigen, ist dieser Effekt in *stm-2/las-4* verstärkt (Abb. 3.6.L). Dabei führt ein stark verspätetes Abtrennen der

Petiolen vom Hauptspross zu einem Phänotyp, der einer bei *clavata*-Mutanten auftretenden Fasziation ähnelt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass *las-4*-Pflanzen in Bezug auf die frühe postembryonale Entwicklung - anders als die *revoluta*-Mutation - keinen Einfluss auf *stm-2* hat. Während bei *rev-6/stm-2*-Mutanten deutlich mehr Pflanzen keine postembryonale Organogenese mehr durchführen können (Otsuga et al., 2001) als bei *stm-2*-Einzelmutanten, ist dies bei *stm-2/las-4*-Pflanzen nicht der Fall. *las-4/stm-2*-Pflanzen zeigen starke Fusionen von Petiolen und die Architektur der Pflanzen ist verändert. Außerdem bildeten *stm-2/las-4*-Pflanzen terminale Blüten, dabei wurde auch florale Reversion dokumentiert.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass *LAS* und *STM* teilweise redundante Funktionen haben, beispielsweise bei der Trennung von Organen und der Entwicklung der Infloreszenz, was sich in der Doppelmutante dann verstärkt phänotypisch auswirkt.

3.1.7 Charakterisierung von *wus-1/las-4*-Doppelmutanten

Ähnlich wie die *stm-2*-Mutation führt auch eine Mutation im *WUSCHEL*-Gen zu einem „*Stop and go*“-Wachstum während der postembryonalen Entwicklung. Das *WUSCHEL*-Gen ist an der Regulation der Größe der Stammzellpopulation in der zentralen Zone des Meristems beteiligt (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). In *wus-1*-Mutanten bildet sich zwar ein Meristem, es kann aber nur wenige Organe formieren bevor seine Stammzellpopulation aufgebraucht wird. Es etablieren sich aber wieder neue Meristeme, die wiederum einige Blätter bilden usw. *wus-1*-Blüten sind ebenfalls durch ein Fehlen der inneren Organe charakterisiert.

Otsuga et al. (2001) konnten nachweisen, dass in *rev-6/wus-1*-Mutanten die postembryonale Organogenese gegenüber *wus-1*-Mutanten stark unterdrückt wird. Da es sich bei *revoluta-6* um eine Mutation handelt, die unter anderem die Anlage von Achselmeristemen unterdrückt, legt dieses Ergebnis den Schluss nahe, dass die in *wus-1* nach einem Wachstumsstopp neu gebildeten Meristeme den Charakter von Achselmeristemen haben.

Da *wus-1*-Mutanten keine inneren Blütenorgane bilden, mussten für die Kreuzung *wus-1* heterozygote Pflanzen verwendet werden (Abschnitt 2.2.4.1.).

In der F₂-Generation wurden die Nachkommen von zwei F₁-Linien ausgelegt. Eine segregierte nur für *las-4*, in der anderen spalteten sowohl *las-4* als auch *wus-1* auf. Tabelle 3.6. fasst das Ergebnis der Analyse zusammen.

Keimungsrate	Wt	<i>las-4</i>	<i>wus-1</i> + <i>wus-1/las-4</i>
89 % (62/70)	33	10	17
(Erwartung)	(34,9)	(11,6)	(15,5)

Tabelle 3.6. Phänotypische Charakterisierung der F₂-Generation einer Kreuzung von *las-4* und *wus-1*. 2 Pflanzen zeigten eine offensichtlich durch Insektenbefall ausgelöste Wuchsstörung, die keinem der Phänotypen ähnelten und wurden nicht in die weiteren Untersuchung einbezogen. Die Werte der erwarteten Segregation beziehen sich auf die 9 : 3 : 4 (Wt : *las-4* : *wus-1* + *wus-1/las-4*) bezogen auf die Zahl der tatsächlich in die Analyse einbezogenen Pflanzen. Weitere Erläuterung im Text.

Es konnten 33 wildtypische Pflanzen, 10 *las-4*-Pflanzen und 17 *wuschel*-Phänotypen identifiziert werden. Da keine *wus-1*-Pflanzen identifiziert wurden, die einen Wachstumsstop zeigten, konnte keine Gruppe von Doppelmutanten klar identifiziert werden. Um Doppelmutanten zu identifizieren, sollten homozygote *las-4*-Pflanzen gefunden werden, die heterozygot für *wus-1* sind. Zu diesem Zweck wurden aus der F₂ 6 Pflanzen mit einem *las-4*-Erscheinungsbild ausgewählt und geselbstet. Die Nachkommen wurden erneut ausgelegt und 2 Linien identifiziert, die für *wus-1* aufspalteten, allererstlichen Pflanzen zeigten den *las-4*-Phänotyp. Da alle Pflanzen genotypisch *las-4/las-4* waren, handelte es sich bei den gefundenen *wus-1*-Pflanzen um Doppelmutanten.

Eine dieser F₃-Linien wurde genauer analysiert. Tabelle 3.7. zeigt die Analyse der frühen postembryonalen Entwicklung von *wus-1*- und *wus-1/las-4*-Pflanzen.

	Keimungs- rate	Phänotyp 2	Wachstums-stop	Blattfusion
<i>wus-1/las-4</i>	89 % (93/105)	21 <i>wus-1/las-4</i>	0	21(stark)
<i>wus-1</i>	62 % (65/105)	14 <i>wus-1</i>	0	2(schwach)

Tabelle 3.7. Phänotypische Charakterisierung von Linien einer F₃-Generation, die für *wus-1/las-4* bzw. *wus-1* segregierten. Zusätzlich wurden alle *wus-1* und *wus-1/las-4* Pflanzen auf einen frühen Wachstumsstop hin überprüft. Das Auftreten von Blattfusionen wurde bei älteren Pflanzen untersucht.

Die niedrige Keimungsrate beider Linien wird auf eine zu kurze Zeit zwischen dem Abernten der Mutterpflanze und der erneuten Aussaat zurückgeführt. Von 105 ausgelegten Pflanzen

keimten 93, davon 73 *las-4*-Pflanzen und 21 *wus-1/las-4*-Pflanzen. Keine der 21 Pflanzen zeigte einen völligen Wachstumsstop, es wurde lediglich die Beobachtung gemacht, dass die frühe postembryonale Entwicklung offensichtlich bei Doppelmutanten langsamer ablief als bei *wus-1* Einzelmutanten.

Als Kontrolle wurde eine Linie ausgelegt, die für *wus-1* segregiert. Es keimten lediglich 65 von 105 ausgelegten Samen. 21 Wildtyppflanzen und 14 *wus-1*-Mutanten konnten identifiziert werden. Keine der *wus-1* zeigte einen völligen Wachstumsstop.

Abbildung 3.7. zeigt die phänotypische Charakterisierung der *wus-1*- und *wus-1/las-4*-Pflanzen.

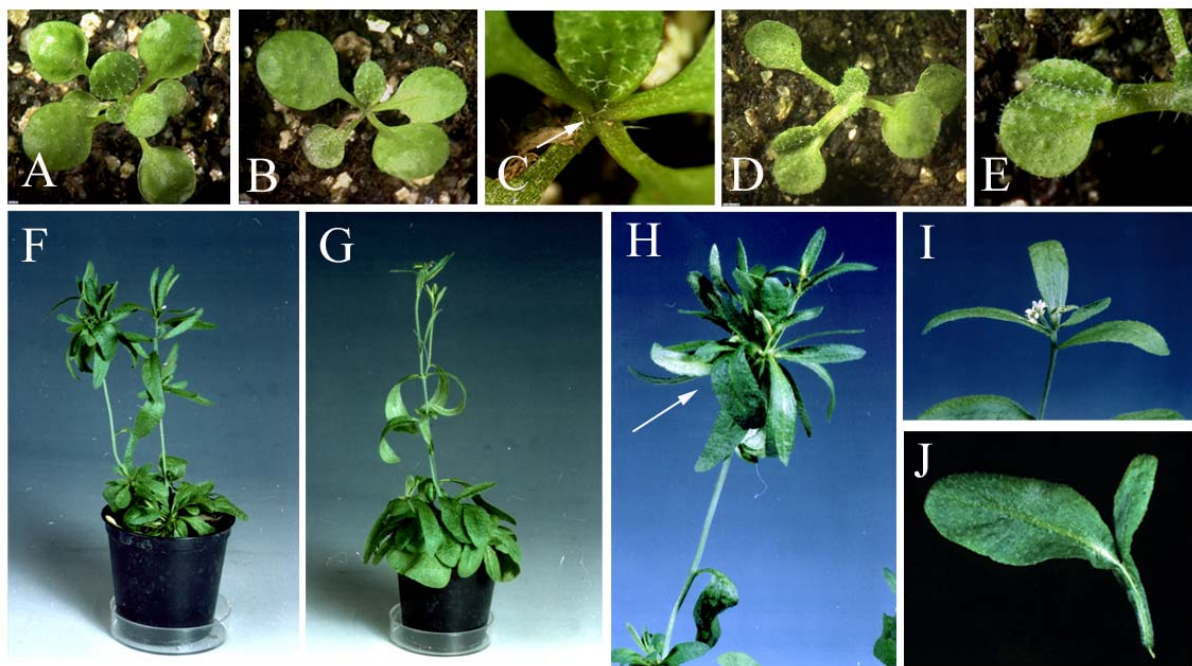


Abb. 3.7.: Phänotypische Charakterisierung von *wus-1* (B,C,F,H) und *wus-1/las-4* (D,E,G,I,J) im Vergleich zum Wildtyp (A). Abbildungen A-E zeigen Pflanzen nach 27 Tagen Kurztabedingungen. F: Habitus einer *wus-1*-Pflanze. G: zeigt den Habitus von *wus-1/las-4*. H: Nahaufnahmen einer Luftrosette von *wus-1* (H, Pfeil markiert die Luftrosette) zu sehen, die Infloreszenz einer *wus-1/las-4*-Pflanze (I) und fusionierte Blätter einer *wus-1/las-4*-Pflanze (J). Weitere Informationen im Text.

Während der frühen postembryonalen Entwicklung bildet das primäre SAM von *wus-1*-Mutanten zunächst mehrere Folgeblätter, stellt dann aber das Wachstum ein (Abb.3.7.B). Dies wird in der Großaufnahme einer 27 Tage alten Pflanze verdeutlicht (Abb.3.7.C). Der Pfeil markiert die Basis des letzten gebildeten Folgeblattes, an dessen Basis kein neues Blatt entsteht.

Der Vergleich mit einer Wildtyp-Pflanze (Abb. 3.7.A) des gleichen Alters zeigt, dass diese schon deutlich mehr Folgeblätter gebildet hat. Eine 27 Tage alte *wus-1/las-4* -Pflanze ist in

Abbildung 3.7.D dargestellt. Die Doppelmutanten zeigten ein langsames Wachstum als die *wus-1*-Pflanzen. Die Phyllotaxis der ersten gebildeten Blätter war häufig verändert, was aber vermutlich auf die in großer Zahl auftretenden Organfusionen zurückzuführen ist. Abbildung 3.7.E zeigt eine Großaufnahme zweier Blätter, deren Petiolen und die Basis der Blattspreite fusioniert sind. Zwei Blätter einer älteren *wus-1/las-4*-Pflanze mit ebenfalls fusionierten Petiolen und der Basis der Blattspreite sind in Abbildung 3.7.J gezeigt. Die genauere Überprüfung ergab je eine schwache Fusion der basalen Bereiche der Petiolen bei 2 von 14 *wus-1*-Pflanzen. Außerdem bildete jede der 21 untersuchten *wus-1/las-4*-Pflanzen mehrere starke Fusionen der Petiolen bis in den Bereich der Blattspreite aus (Tabelle 3.7).

Die phänotypische Charakterisierung älterer Pflanzen ergab, dass sowohl in *wus-1* (Abb. 3.7.F) als auch in *wus-1/las-4* (Abb. 3.7.G) Sprosse mit verlängerten Internodien auswuchsen. *wus-1*-Pflanzen bildeten häufig Luftrosetten (Abb. 3.7.H, Pfeil), die Doppelmutanten (Abb. 3.7.I) zeigten dies nicht.

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass *las-4* die postembryonale Organogenese in *wus-1* Mutanten nicht unterdrückt. Während der späteren Entwicklung ist aber in Doppelmutanten keine Bildung von Luftrosetten zu beobachten. Außerdem sind in *wus-1/las-4*-Pflanzen Organfusionen in hoher Frequenz zu beobachten. Dieser Effekt, der in *wus-1* in niedriger Frequenz zu beobachten ist, wird durch *las-4* verstärkt. *LAS* und *WUS* haben offenbar eine redundante Funktion bei der Trennung von Organen.

3.1.8 Charakterisierung von *clv3-2/las-4*-Doppelmutanten

Ebenfalls an der Regulation der Stammzellpopulation im SAM beteiligt sind die Gene *CLAVATA1*, 2 und 3 (Clark et al., 1993, 1995 und 1997; Kayes und Clark, 1998; Jeong et al., 1999; Fletcher et al., 1999). Im Gegensatz zu *wus-1*-Mutanten weisen die jeweiligen Mutanten aber ein vergrößertes Meristem auf, was während des postembryonalen Wachstums zu einer veränderten Phyllotaxis und der Fasziation des Hauptsprosses führt. Außerdem kommt es zur Bildung von Blüten mit einer höheren Anzahl Organe, insbesondere der inneren. Für die Kreuzung wurde *clv3-2* gewählt, da Mutationen in allen 3 Genen einen ähnlichen Phänotyp aufweisen und der *CLV3* Locus sich auf Chromosom 2 befindet und somit nicht mit *las-4* gekoppelt ist. Durchführung der Kreuzung siehe Abschnitt 2.2.4.1..

Wie in Tabelle 3.8. aufgeführt konnten in der F₂-Generation 4 phänotypische Gruppen von Pflanzen unterschieden werden.

Wt	<i>las-4</i>	<i>clv3-2</i>	<i>clv3-2/las-4</i>
41 (38,25)	12 (12,75)	12 (12,75)	3 (4,25)

Tabelle 3.8. :Auswertung der F₂-Generation der Kreuzung *las-4* und *clv3-2*. Die in Klammern stehenden Werte der erwarteten Segregation beziehen sich auf die erwarteten 9 : 3 : 3 : 1 (Wt : *las-4* : *clv3-2* : Doppelmutante) bezogen auf die Zahl der tatsächlich in die Analyse einbezogenen Pflanzen. Weitere Erläuterung im Text

Es wurden 41 wildtypische Pflanzen, 12 *las-4*, 12 *clv3-2* und 3 Pflanzen untersucht, die *clv3-2* Merkmale zeigten, aber keine Seitentriebe aus der Rosette bildeten. Bei 68 analysierten Pflanzen war rechnerisch eine Segregation von 38,25 : 12,75 : 12,75 : 4,25 erwartet, die relativ eng mit der tatsächlich erfassten übereinstimmt.

Bei einem Vergleich der Phänotypen von *clv3-2* (Abb.3.8.A) und *clv3-2/las-4* (Abb. 3.8.B) ist zu erkennen, dass beide einen stark faszierten Hauptspross aufweisen und eine veränderte Phyllotaxis, da durch das vergrößerte Meristem mehr Blätter gebildet werden. Bei den Doppelmutanten wachsen weniger Seitentriebe aus, was möglicherweise auf die unterdrückte Seitensprossbildung in Achseln von Rosettenblättern zurückzuführen ist.



Abb.3.8: Phänotypische Analyse von *clv3-2* (A,C) und *clv3-2/las-4* (B,D). A und B zeigen Habitusaufnahmen, C und D Nahaufnahmen von Blüten bzw. der Infloreszenz. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Kein Unterschied konnte festgestellt werden zwischen Infloreszenzen bzw. Blüten von *clv3-2*- (Abb. 3.8.C) und *clv3-2/las-4*-Pflanzen (Abb. 3.8.D). Beide zeigten mehr Blütenorgane und bildeten verdickte, keulenartige Schoten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Kombination aus *clv3-2* und *las-4* zu einem additiven Phänotyp führt.

3.1.9 Charakterisierung von *lfy-14/las-4*-Doppelmutanten

Beim *LEAFY*-Gen handelt es sich um ein Meristem-Identitätsgen, das während der Pflanzenentwicklung für den Übergang vom vegetativen zum Infloreszenzmeristem notwendig ist. Dabei ist dieser Übergang nur teilweise gestört, da sich nach der Blühinduktion ein Hauptspross bildet. Dieser weist verlängerte Internodien auf, wodurch sich die Gesamtarchitektur der Pflanze ändert. Unter Kurztagbedingungen zeigt die *leafy-14*-Mutante einen starken Phänotyp, da sie anstatt floralen Meristemen ausschließlich Stängelblätter mit neuen Seitentrieben bildet. Zieht man *leafy-14*-Mutanten unter Langtagbedingungen an, bilden sich Meristeme die floralen Meristemen ähneln. Die genauere Analyse zeigt aber, dass die gebildeten Organe durchweg den Charakter von Blättern haben und außerdem nicht in Wirteln sondern spiralförmig angelegt sind (Weigel et al., 1992).

Eine mögliche Erklärung dafür, dass die *las-4*-Mutante in vegetativen Rosettenblättern einen mutanten Phänotyp zeigt, nicht aber in Achseln von Stängelblättern und in Blüten - obwohl *LAS* im Wildtyp dort auch exprimiert wird - ist, dass während der Blühinduktion redundante Regulationsmechanismen aktiviert werden. In diesem Experiment sollte *las-4* mit *lfy-14* gekreuzt werden, um zu prüfen, ob bei einem unvollständigen Übergang vom vegetativen zum Infloreszenzmeristem *las-4* Seitentriebe aus Stängelblättern bilden kann.

Die *lfy-14/las-4*-Doppelmutante war bereits im Labor vorhanden. Da *leafy-14* aufgrund des Meristemphänotyps nicht fertil ist, wurde mit einer Linie gearbeitet, die homozygot für *las-4* ist und heterozygot für *lfy-14*.

Für erste Charakterisierungen der Doppelmutante waren die Pflanzen für 3 Wochen im Kurztag angezogen und anschließend zur Blühinduktion in Langtagbedingungen transferiert worden. Dabei wurden nur additive Effekte festgestellt. Die Pflanzen bildeten keine Seitensprosse aus Rosettenblättern, wohl aber aus Stängelblättern. Des Weiteren zeigten sie den für *lfy-14* typischen Meristem-Phänotyp und bildeten schließlich blütenähnliche Strukturen, die aber nur aus Organen mit Blattidentität bestanden.



Abb.3.9: Phänotypische Analyse von Columbia (A 1.v.l., B,F,J), *lfy-14* (A 2.v.l., C,G,K), *lfy-14/las-4* (A 3.v.l., D,H,L), und *las-4* (A 4.v.l., E,I,M). A: Vergleich der Habitusaufnahmen, die Nahaufnahmen zeigen die Blattrosette (B,C,D,E), Stängelblätter am Hauptspross (F,G,H,I) und die Infloreszenz (J,K,L,M). Weitere Erläuterungen im Text.

Da der *lfy-14*-Phänotyp wie bereits erwähnt, unter Kurztagbedingungen wesentlich stärker ausgeprägt ist als unter Langtagbedingungen, wurden die Pflanzen unter Kurtztagbedingungen erneut angezogen. Die Auswertung dieses Experiments wird in Abbildung 3.9. zusammengefasst.

In Abbildung 3.9.A sind Habitusaufnahmen von Columbia, *lfy-14*, *lfy-14/las-4* und *las-4* (von links nach rechts) gegenübergestellt. Die Pflanzen unterscheiden sich zu diesem Zeitpunkt kaum in der Größe. Zu erkennen ist aber, dass *lfy-14*- und *lfy-14/las-4*-Pflanzen wesentlich mehr Stängelblätter bilden als *las-4* und Columbia. Schon hier wird deutlich, dass die Doppelmutante im Gegensatz zu den drei anderen Pflanzen keine Seitentriebe aus Stängelblättern bildet.

In den Abbildungen 3.9.B-E sind Nahaufnahmen von Blattrosetten der Pflanzen gezeigt. Zu sehen ist, dass sich bei Columbia (Abb. 3.9.B) und *lfy-14* (Abb. 3.9.C) Seitentriebe in der Rosette bilden. Die Pfeile markieren auswachsende Triebe aus der Rosette. Dagegen ist die Achselmeristembildung bei *lfy-14/las-4* (Abb. 3.9.D) und *las-4* (Abb. 3.9.E) unterdrückt. Die Pfeile markieren jeweils die Achsel eines Rosettenblattes, das keinen Spross bildet.

Grossaufnahmen von Stängelblättern sind in Abb. 3.9.F-I gezeigt. Während Columbia (Abb. 3.9.F), *lfy-14* (Abb. 3.9.G) und *las-4* (Abb. 3.9.I) Seitentriebe aus Stängelblättern bilden, ist die Bildung von Sprossen aus den meisten Stängelblättern von *lfy-14/las-4* (Abb. 3.9.H) unterdrückt. Die Pfeile markieren leere Achseln von Stängelblättern. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass Stängelblätter von Doppelmutanten kleiner waren und die Blattoberseite in einem kleinerem Winkel zu Hauptspross stand, also leicht nach oben zeigte. Während Columbia (Abb. 3.9.J) und *las-4* (Abb. 3.9.M) Blüten bildeten, produzierte das Sprossmeristem von *lfy-14* (Abb. 3.9.K) weiterhin Stängelblätter mit Seitensprossen. Wie bei *lfy-14*-Pflanzen behält das Meristem nach der Elongation der Internodien vegetativen Charakter und produziert fortwährend Stängelblätter. Im Gegensatz zu *lfy-14*-Pflanzen legen die meisten Stängelblätter keine Seitentriebe an. Somit verstärkt *lfy-14* den *las-4* Verzweigungs-Phänotyp. Doppelmutanten bildeten Stängelblätter zumeist ohne Seitensprosse (Abb. 3.9.L). Der beobachtete Verzweigungsphänotyp wurde, wie in den Diagrammen 3.10.A und B beschrieben, detaillierter charakterisiert.

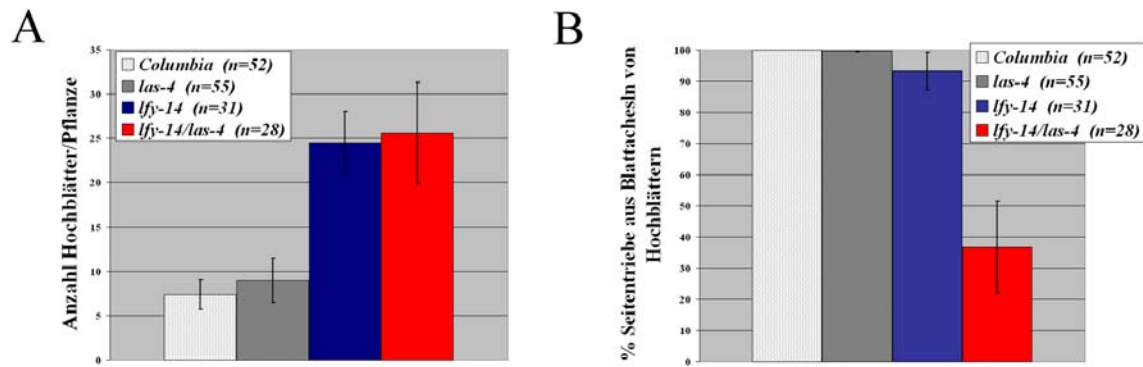


Abb. 3.10: Anzahl von Stängelblättern und Bildung von Seitentrieben aus Stängelblättern. **A:** Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl an Stängelblättern pro Pflanze in *lfy-14*-, *lfy-14/las-4*-, *las-4*- und Columbia-Pflanzen. **B:** illustriert die Zahl der gebildeten Seitentriebe aus Stängelblättern im Verhältnis zur Anzahl der Stängelblätter pro Pflanze angegeben von *lfy-14*-, *lfy-14/las-4*-, *las-4*- und Columbia-Pflanzen. Weitere Erläuterungen im Text.

Dabei wurde zunächst die Anzahl der Stängelblätter bestimmt. Dabei ist anzumerken, dass sich diese Zahl bei Columbia- und *las-4*-Pflanzen später nicht mehr verändert, da das Meristem, anders als bei *lfy-14* und Doppelmutanten, nach der Blühinduktion nur noch Blütenmeristeme produzierte.

Das Ergebnis ist im Diagramm 3.10.A gezeigt. Dabei wird deutlich, dass Columbia und *las-4* mit 7,4 und 9 etwa gleich viele Stängelblätter bilden. Dagegen bilden *lfy-14* und Doppelmutanten durchschnittlich mehr Stängelblätter und wiederum etwa gleich viele.

Weiterhin wurde erfasst, wie viel Prozent der Stängelblätter pro Pflanze durchschnittlich Seitentriebe bildeten. Im Diagramm 3.10.B ist zu erkennen, dass in Columbia-Pflanzen alle Stängelblätter einen Spross bilden, bei *las-4* ist unter diesen Anzuchtbedingungen bei einem geringen Prozentsatz der Pflanzen ein kleiner Teil der ältesten Stängelblätter leer. Ein leichter Effekt ist auch bei *lfy-14*-Mutanten zu sehen, etwa 7 Prozent der Blattachsen sind leer. Dabei ist anzumerken, dass die leeren Blattachsen nicht immer die der ältesten Blätter waren wie bei *las-4*. Sie waren über den ganzen Spross verteilt.

Dagegen ist ein deutlicher Effekt bei *lfy-14/las-4*-Doppelmutanten zu erkennen. Lediglich durchschnittlich 36,8 % der Stängelblätter bildeten Sprosse. Die wenigen Stängelblätter, die Seitentriebe bildeten, schienen unregelmäßig am Hauptspross verteilt.

Das Ergebnis wurde durch Wiederholung des Experimentes bestätigt.

Zusammenfassend kann man bemerken, dass *lfy-14/las-4*-Doppelmutanten wie *lfy-14* bei Anzucht unter Kurztagbedingungen Infloreszenzmeristeme mit vegetativem Charakter bilden. Während *lfy-14* Seitentriebe in den Achseln der meisten Stängelblätter anlegt ist dies bei *lfy-*

l4/las-4 in den meisten Stängelblättern unterdrückt. Dies lässt den Schluss zu, dass *lfy-14* den Verzweigungsphänotyp von *las-4* verstärkt.

3.1.10 Charakterisierung von *ap1-10/las-4*-Doppelmutanten

Ein interessanter Aspekt bei der Charakterisierung der *las-4* Mutante ist, dass die Unterdrückung der Achselmeristem-Initiation sich auf die vegetative Wachstumsphase beschränkt, obwohl *LAS* auch in Achseln von Stängelblättern und auch an der Basis von Sepalen in Blüten exprimiert wird (Greb et al.2003).

Hinweise auf eine Funktion von *LAS* während der reproduktiven Phase liefert die Beobachtung, dass die Mutation des orthologen Gens aus Tomate zu einem Verlust der Sepalen führt. Außerdem deckte die Analyse von *axr1-12/las-4*-Mutanten eine Rolle von *LAS* bei einem Teilaspekt der Verzweigung aus den Achseln von Stängelblättern auf (siehe Abschnitt 3.1.2.).

Um einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Funktion von *LAS* in Blüten zu sammeln, wurde die Kreuzung zwischen *las-4* und *ap1-10* durchgeführt.

ap1-10-Mutanten werden im Wesentlichen durch zwei Entwicklungsdefekte charakterisiert. Zum einen bilden sie keine Petalen, zum anderen bilden vor allem die ersten floralen Meristeme ektopische Blüten am Blütenstiel oder aus den Achseln von Sepalen. Dies geschieht, da *AP1* einerseits eine Funktion als Meristem-Identitätsgen hat und andererseits eine Funktion als Blütenorgan-Identitätsgen, das die Identität von erstem und zweitem Blütenwirtel festlegt (Mandel et al., 1992; Weigel et al., 1992).

Das *ap1-10*-Allel zeigt einen starken Phänotyp und befindet sich wie *las-4* in einem Columbia-Hintergrund.

Die Kreuzung wurde durchgeführt wie in Abschnitt 2.2.4.1. angegeben

Keimungsrate	Wildtyp	<i>las-4</i>	<i>ap1-10</i>	<i>ap1-10/las-4</i>
96 % (101/105)	49	25	25	2

Tabelle 3.9. :Auswertung der F₂-Generation der Kreuzung *las-4* und *ap1-10*. Weitere Erläuterung im Text

Wie in Tabelle 3.9. aufgeführt spaltete die F₂-Generation in 4 phänotypische Gruppen auf. Es wurden 49 Wildtypen, 25 *las-4*, 25 *ap1-10* und 2 Pflanzen festgestellt, die keine Petalen

hatten und keine Seitentriebe aus der Rosette austrieben. Die Zahl der gefundenen Doppelmutanten war geringer als bei einer 9 : 3 : 3 : 1 Segregation erwartet. Allerdings liegen *LAS* und *API* beide auf Chromosom 1, sind also gekoppelt.

Die phänotypische Charakterisierung von *apl-10* und *apl-10/las-4* Doppelmutanten ist in Abbildung 3.11. dargestellt. Anhand der Habitusaufnahmen von *apl-10* (Abb. 3.11.A) und *apl-10/las-4* (Abb. 3.11.B) kann man ersehen, dass beide Pflanzen in ihrer Gesamtgröße nicht abweichen. Sowohl Einzel- als auch Doppelmutante bilden keine Petalen. Die Nahaufnahme der Blattrosette einer *apl-10*-Mutante zeigt eine normale Verzweigung. Der Pfeil markiert eine Achselknospe an der Basis eines Rosettenblattes. Im Gegensatz dazu wurden keine Seitensprosse aus der Rosette von Doppelmutanten gebildet. Durch den Pfeil wird die Basis eines Rosettenblattes markiert, das keine Knospe bzw. Spross bildet. Des Weiteren wurde die Verzweigung aus Achseln von Stängelblättern bei Anzucht der Pflanzen unter Kurztagbedingungen analysiert. Wie in den Abbildungen 3.11.E-G gezeigt, verzweigen sich Einzel- und Doppelmutante aus Achseln von Stängelblättern wildtypisch. In Abbildung 3.11.E ist das Stängelblatt einer *apl-10/las-4*-Pflanze mit einem auswachsenden Trieb (Pfeil) gezeigt. Die Zahl der Stängelblätter wurde, wie im Diagramm 3.11.F illustriert, bestimmt und war mit durchschnittlich 11,1 bei *apl-10* und 11,8 bei *apl-10/las-4* pro Pflanze ähnlich. Ebenfalls wurde ermittelt, wie viel Prozent der Stängelblätter Seitentriebe angelegt wurden (Abb. 3.11.G). Dabei stellte sich heraus, dass Einzel- und Doppelmutanten aus allen *apl-10* bzw. nahezu allen *apl-10/las-4* Blattachseln Triebe bildeten.

Außerdem wurde der bereits erwähnte Aspekt der Bildung ektopischer Blüten in *apl-10*-Mutanten untersucht. Die Infloreszenz einer *apl-10*-Pflanze ist in Abbildung 3.12.A gezeigt. Zu erkennen ist, dass alle Blüten keine Petalen bilden. Der Pfeil markiert eine ektopische Blüte, die an der Basis einer Blüte entstanden ist. Die Nahaufnahme einer solchen Blüte ist in Abbildung 3.12.B dargestellt. Die Pfeilspitze markiert eine Schote, an deren Basis zwei neue Blüten entstanden sind. Die Blüte rechts ist aus der Achsel einer Sepale entstanden. Im Gegensatz zur primären Blüte bilden die ektopischen Blüten wieder teilweise Petalen. In Abbildung 3.12.C ist die SEM-Aufnahme einer *apl-10*-Blüte abgebildet. Mittig zu sehen ist ein Gynöceum (Pfeilspitze), das teilweise durch eine Sepale mit carpelloidem Charakter verdeckt ist und zwei ektopische Blüten (Pfeile), die an der Basis der Schote entstanden sind. Im Vergleich dazu zeigt die Abbildung 3.12.D die Infloreszenz einer *apl-10/las-4*-Doppelmutante. Bei erster Begutachtung fielen kaum Blüten mit zusätzlichen ektopischen Blüten auf. Die Großaufnahme einer solchen Blüte bestätigt, dass keine Petalen gebildet

werden und ebenfalls keine ektopischen Blüten. In der SEM-Aufnahme ist ebenfalls keine Bildung ektopischer Blüten zu erkennen (Abb. 3.12.F).

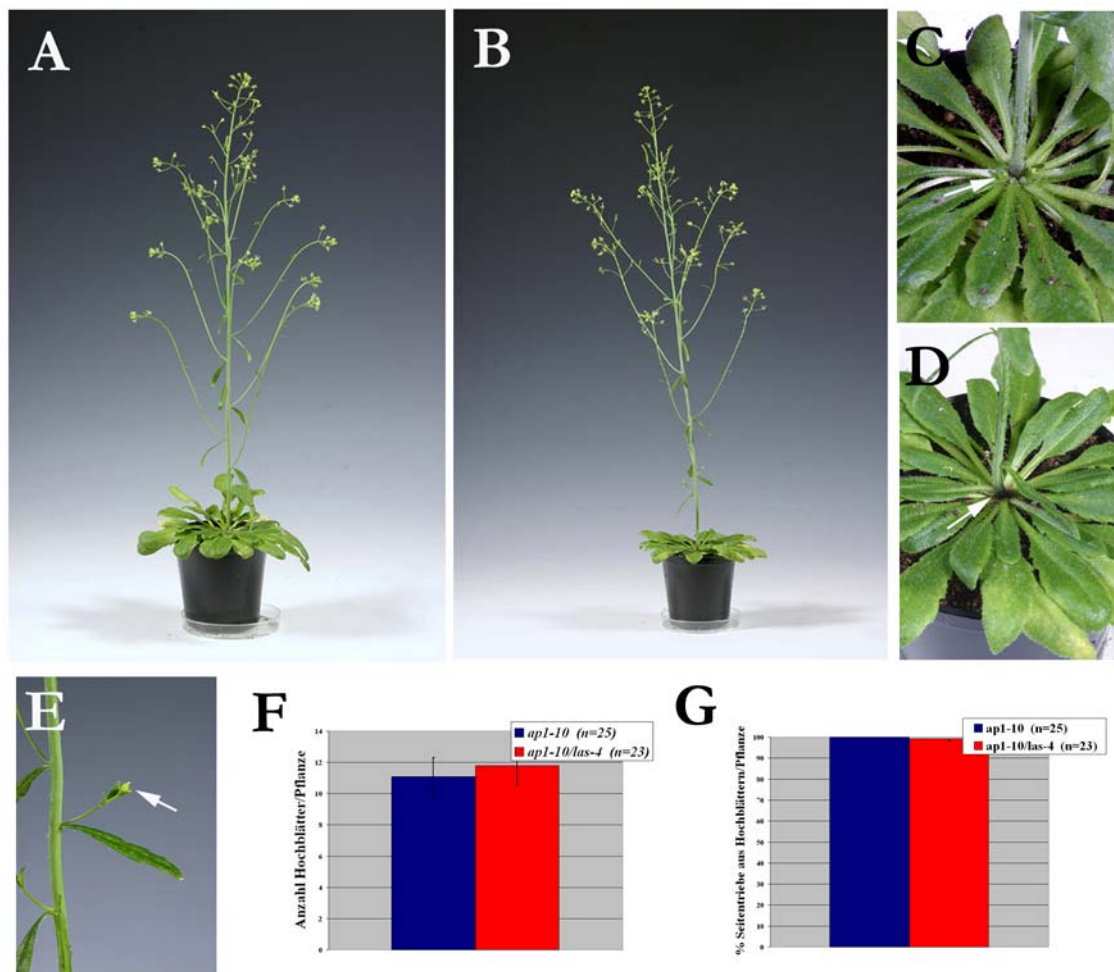


Abb. 3.11.: Phänotypische Charakterisierung von *ap1-10* (A, C) und *ap1-10/las-4* (B,D,E). Zu sehen sind Habitusaufnahmen einer *ap1-10*-Pflanze (A) und einer *ap1-10/las-4*-Pflanze (B). C: Nahaufnahme der Blattrosette einer *ap1-10*-Mutante. Der Pfeil markiert Knospen in den Achseln von Rosettenblättern. In D ist die Nahaufnahme der Rosette einer *ap1-10/las-4*-Doppelmutante abgebildet. Der Pfeil markiert leere Blattachseln in der Rosette. E: Stängelblatt einer Doppelmutante, der Pfeil deutet auf die Infloreszenz eines Seitentriebes. Das Diagramm in F stellt die Anzahl Stängelblätter pro Doppel- und Einzelmutante dar. G illustriert die Anzahl Seitentriebe aus Stängelblättern pro Pflanze in %. Weitere Erläuterungen im Text.

Aufgrund der Tatsache, dass auch *ap1-10*-Einzelmutanten nicht aus allen Blüten ektopische Blüten bildeten, wurde dieser Aspekt bei Einzel- und Doppelmutante in einer genaueren Erhebung analysiert. Dabei wurden bei jeweils 20 Pflanzen die 20 ältesten Blüten auf die Anzahl der ektopischen Blüten, die pro Blütenstiel gebildet wurden, hin untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in den Diagrammen G und H der Abbildung 3.12. illustriert. Die Zahlen 1-20 der X-Achse entsprechen dem ältesten (1) bis zum jüngsten (20) in die Untersuchung einbezogenen Blütenstiel. Die Balkenhöhe korreliert mit der Anzahl gezählter Blüten.

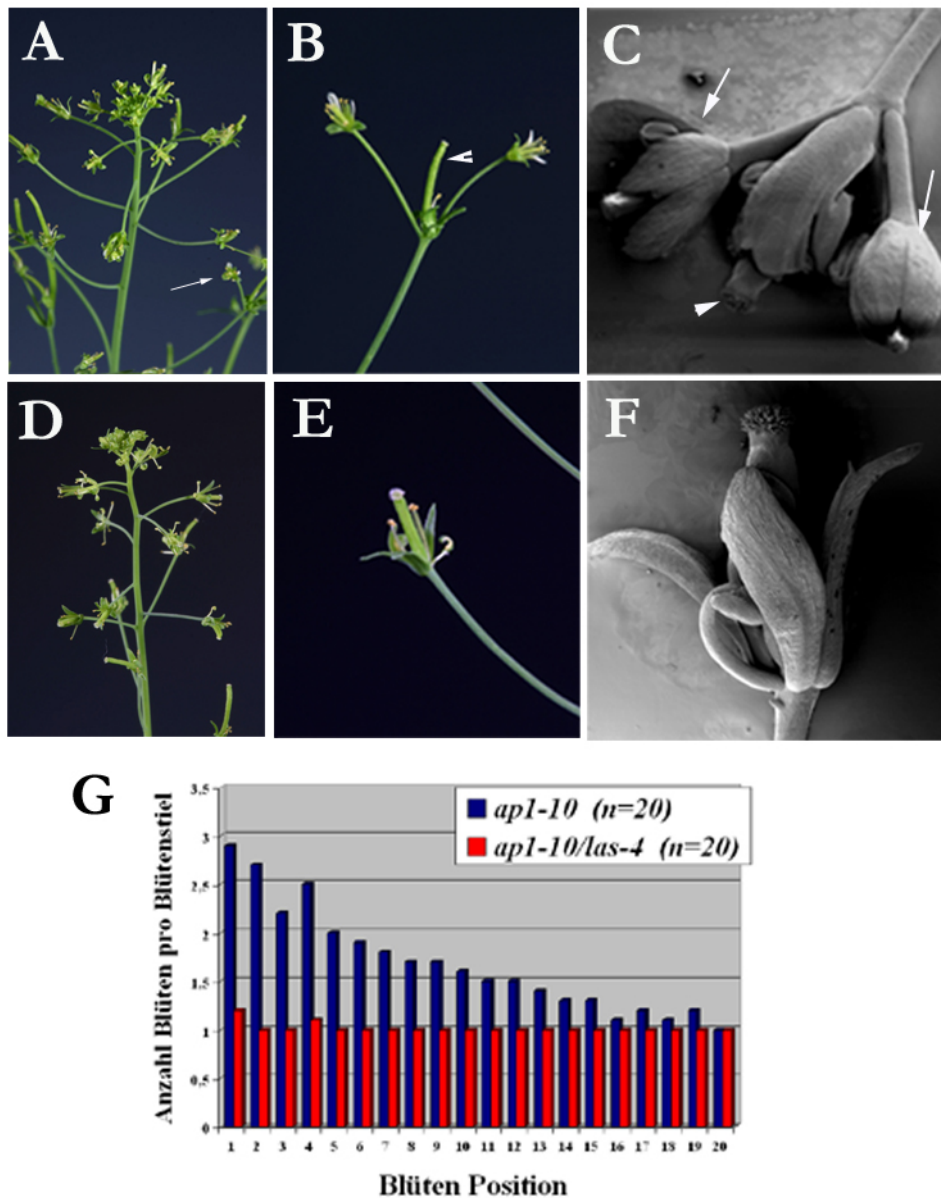


Abbildung 3.12.: Bildung ectopischer Blüten in *ap1-10*- und *ap1-10/las-4*-Pflanzen. **A:** Infloreszenz einer *ap1-10*-Pflanze, der Pfeil markiert eine ectopische Blüte. In **B** ist die Schote einer *ap1-10*-Pflanze abgebildet (Pfeilspitze), an deren Basis 2 ectopische Blüten auswachsen. **C:** SEM-Aufnahme von *ap1-10* Blüten. Die Pfeilspitze deutet auf ein Gynöceum, die Pfeile markieren 2 ectopische Blüten. Außerdem sind die Infloreszenz (**D**), die Nahaufnahme einer Blüte (**E**) und die SEM Aufnahme (**F**) der Blüte von *ap1-10/las-4*-Doppelmutanten gezeigt. **G:** Zahl der Blüten der ersten 20 Blütenstiele bei *ap1-10* und *ap1-10/las-4*. Weitere Informationen im Text.

Bei Col- und *las-4*-Pflanzen ist immer nur eine Blüte pro Blütenstiel gefunden worden. Das Diagramm 3.12.G stellt den Vergleich zwischen *ap1-10* und *ap1-10/las-4* dar. Zu sehen ist, dass *ap1-10* vor allem an den ersten Blütenstielen durchschnittlich etwa 3 Blüten bildet, der Durchschnittswert sinkt aber sukzessiv, je später der Entwicklungsschritt erfolgte, in dem die Blüten angelegt wurden.

Bei Doppelmutanten ist eine klare Unterdrückung der Bildung ektopischer Blüten festzustellen. Lediglich die ältesten Blüten bilden teilweise einzelne ektopische Blüten. Ab der 5. Blüte haben die Werte mit geringen Abweichungen Wildtyp-Niveau.

Das Experiment wurde mit ähnlichem Ergebnis 2 mal wiederholt.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass *las-4* sich bezüglich des Verzweigungsmusters epistatisch über *ap1-10* auswirkt. Anders als bei *lfy-14/las-4* ist auch keine Verstärkung des Verzweigungsphänotyps festzustellen. Die Bildung von Seitentrieben aus Stängelblättern ist nicht unterdrückt.

Doppelmutanten bilden wie *ap1-10* keine Petalen. Die Bildung ektopischer Blüten hingegen wird durch *las-4* stark unterdrückt. Das weist darauf hin, dass *LAS* in *ap1-10*-Mutanten gebraucht wird, um die ektopischen Blüten zu produzieren.

3.1.11 Charakterisierung von *ag-1/las-4*-Doppelmutanten

Florale Meristeme produzieren die Blütenorgane Sepalen, Petalen, Stamen und Carpelle. Während sowohl das vegetative als auch das Infloreszenzmeristem laterale Organe in einer spiralförmigen Anordnung produziert, sind die Blütenorgane in Wirteln angeordnet. Das Schicksal der einzelnen Organe wird durch das Zusammenspiel einer Gruppe von Blütenorgan-Identitätsgenen bestimmt (Coen und Meyerowitz, 1991). Das *AGAMOUS*-Gen ist im 3. und 4. Wirtel, in denen sich Stamen und Karpelle formen, exprimiert. Neben der Festlegung von Organ-Identitäten hat es aber ebenfalls eine Funktion bei der Termination des Blütenmeristems. Beides spiegelt sich im Phänotyp der *ag-1*-Mutante wieder. Einerseits produziert das florale Meristem Organwirtel in der Reihenfolge Sepalen, Petalen, Petalen und Sepalen, andererseits ist das Meristem nicht determiniert und fährt mit der Produktion dieser Organe fort (Yanofsky et al., 1990).

LAS kommt bei der Anlage von Lateralmeristemen möglicherweise die Rolle zu, die Identität der meristematischen Zellgruppen in Blattachsen zu erhalten und die weitere Differenzierung der Zellen zu regulieren. *LAS* wird in Blüten in den Achseln von Sepalen exprimiert. In *ag-1*-Mutanten werden fortwährend Sepalen und Petalen produziert. In diesem Experiment sollte überprüft werden ob *LAS* in *ag-1*-Mutanten Funktion bei der Erhaltung des Meristems spielt. Dies wäre beispielsweise der Fall, wenn *LAS* aufgrund von Misexpression bei *ag-1*-Mutanten meristematische Zellen in floralen Meristemen davor schützt zu differenzieren.

Die Kreuzung zwischen *ag-1* und *las-4* wurde wie in Abschnitt 2.2.4.1. angegeben durchgeführt. Da homozygote *ag-1*-Mutanten keinen Pollen produzieren, ist eine heterozygote Pflanze für die Kreuzung verwendet worden. In Tabelle 3.10 sind die in der F₂-Generation gefundenen Segregationsverhältnisse zusammengefasst.

Keimungsrate	Wildtyp	<i>las-4</i>	<i>ag-1</i>	<i>ag-1/las-4</i>
93 % (268/288)	146	50	51	21
(Erwartete Segregation)	(151)	(50)	(50)	(17)

Tabelle 3.10. :Auswertung der F₂-Generation der Kreuzung *las-4* und *ag-1*. Die Werte der theoretischen Segregation beziehen sich auf die erwartete 9 : 3 : 3 : 1 (Wt : Phänotyp 1 : Phänotyp 2 : Doppelmutante) bezogen auf die Zahl der tatsächlich in die Analyse einbezogenen Pflanzen. Weitere Erläuterung im Text

Unter den 268 charakterisierten Pflanzen konnten 4 Phänotypgruppen unterschieden werden. Wie in Tabelle 3.10. dargestellt wurden 146 Wildtyp-Pflanzen, 50 *las-4*, 51 *ag-1*-Einzelmutanten und 21 Doppelmutanten identifiziert. Die Segregationsverhältnisse stimmen mit einer 9 : 3 : 3 : 1 Aufspaltung für 2 ungekoppelte rezessive Mutationen überein.

Wie in Abbildung 3.13. A, C und E dargestellt zeigen die Doppelmutanten phänotypische Merkmale sowohl von *las-4*- als auch *ag-1*-Pflanzen. Der Habitus von *ag-1* (links) und *ag-1/las-4* (rechts) ist in Abbildung 3.13.A nebeneinander dargestellt. Die Unterschiede der Sprosslänge sind auf die Aufspaltung der *erecta*-Mutation in der F₂-Population zurückzuführen. Sie beeinflusst die Sprosslänge und war im genetischen Hintergrund der *ag-1*-Mutation (Landsberg *erecta*) vorhanden. Ansonsten ist in der Abbildung bereits bei beiden Pflanzen der *ag-1*-Blütenphänotyp zu erkennen. Da die Blütenmeristeme nicht terminieren, unterlaufen die Blüten nicht die Seneszenz und bilden keine Schoten. Im Gegensatz zu Wildtyp-Blüten fallen bei älteren Blüten die Petalen nicht ab. Dies verdeutlichen auch die Nahaufnahmen der Infloreszenzen von *ag-1* (Abb 3.13.B) und *ag-1/las-4* (Abb. 3.13.C). Man kann hier außerdem erkennen, dass sich im Inneren der Blüten bereits neue Wirtel von Petalen und Sepalen bilden.

Wie in der Nahaufnahme der Rosette in Abbildung 3.13.E gezeigt, produzieren *ag-1/las-4*-Pflanzen keine Seitentriebe aus der Rosette. *ag-1*-Mutanten hingegen bilden Seitensprosse aus Achseln von Rosettenblättern (Abb. 3.13.D). In Abbildung 3.13.F verdeutlicht die Nahaufnahme zweier Stängelblätter von Doppelmutanten, dass diese Seitensprosse produzieren.

Um bei einer höheren Vergrößerung zu überprüfen, ob *ag-1/las-4*-Blüten terminieren oder nicht, wurden SEM-Aufnahmen durchgeführt. Die SEM-Aufnahme einer *ag-1*-Blüte ist in Abbildung 3.13. G gezeigt. Um einen besseren Blick auf die inneren Wirtel zuzulassen, wurden Petalen und Sepalen entfernt. Zu erkennen ist, dass das florale Meristem im inneren neue Wirtel anlegt und nicht terminiert.

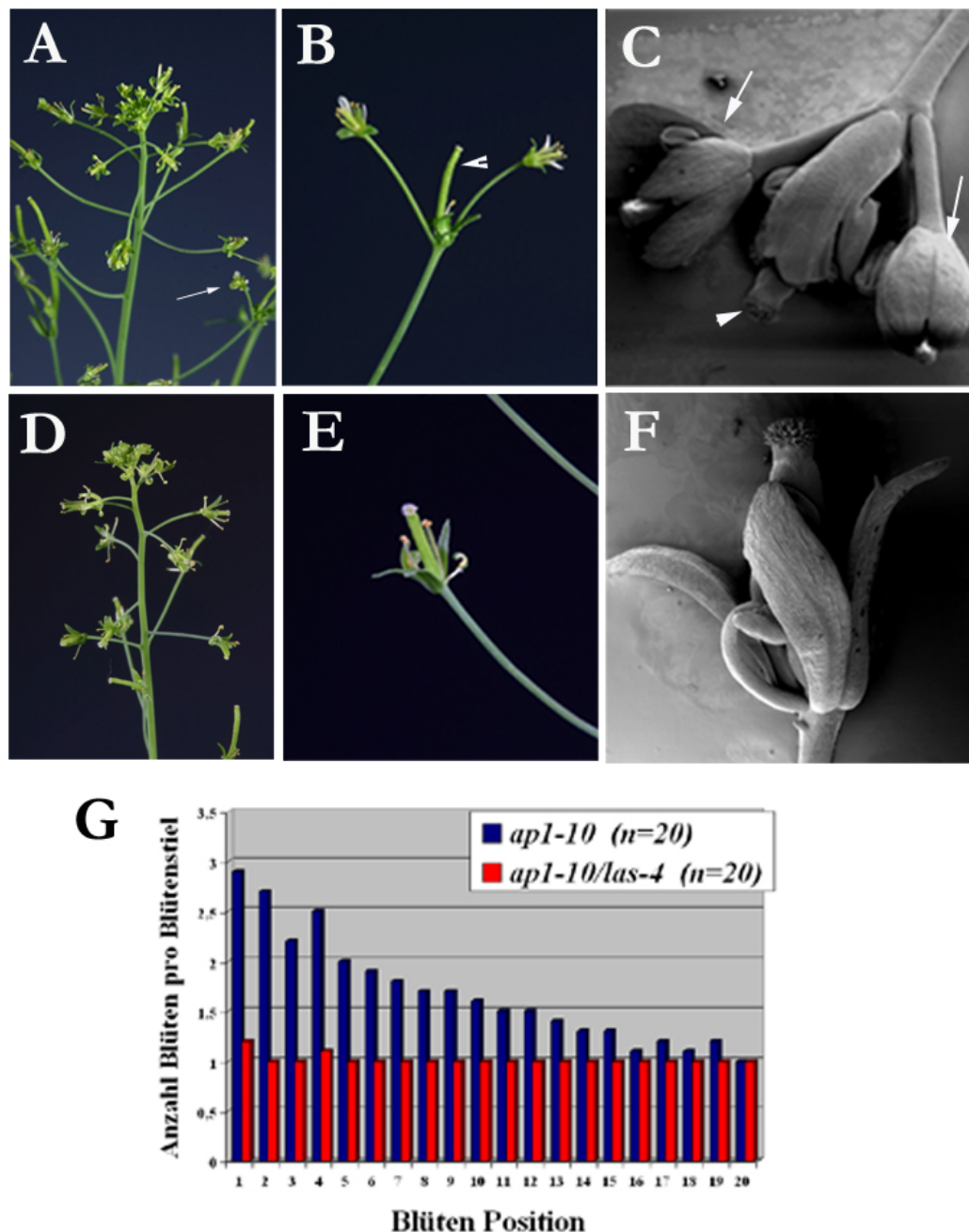


Abbildung 3.13: Phänotypische Charakterisierung von *ag-1*- und *ag-1/las-4*-Mutanten. **A:** Habitusaufnahmen von *ag-1*- (links) und *ag-1/las-4*-Pflanzen (rechts). **B:** *ag-1* Blüten produzieren nur Petalen und Sepalen und sind nicht determiniert. *ag-1/las-4*-Doppelmutanten (**C**) zeigen den gleichen Phänotyp. Wie in **D** gezeigt, bilden *ag-1*-Mutanten Seitentriebe aus der Rosette. Dagegen produzieren *ag-1/las-4*-Pflanzen (**E**) keine Seitentriebe in der vegetativen Wachstumsphase. In **F** ist die Nahaufnahme von Stängelblättern einer Doppelmutante mit Seitentrieben gezeigt. Die SEM-Aufnahmen von *ag-1* (**G**) und *ag-1/las-4* (**H**) bestätigen, dass beide nicht determinierte Blüten produzieren.

In Abbildung 3.13.H ist die SEM-Aufnahme einer *ag-1/las-4*-Blüte gezeigt. Es wurden ebenfalls Sepalen und Petalen entfernt. Die gezeigte Blüte ist etwas jünger als die *ag-1*-Blüte, aber man kann erkennen, dass nur Sepalen und Petalen produziert werden, und dass sich in der Mitte immer noch ein Wachstumskegel befindet, die Blüte also nicht determiniert.

Zusammenfassend kann man zu diesem Experiment sagen, dass die Doppelmutante additive Effekte zeigt. Die Pflanzen zeigen ein *las-4* Verzweigungsmuster und weisen den *ag-1* typischen Blütendefekt auf.

Geprüft werden sollte, ob *LAS* an der Aufrechterhaltung des floralen Meristems von *ag-1* beteiligt ist. In diesem Fall wäre der Blütenphänotyp der Doppelmutante anders als der von *ag-1* gewesen. *LAS* ist in *ag-1*-Mutanten nicht daran beteiligt, die floralen Meristeme vor Termination zu schützen.

3.2 EMS-Mutagenese von *las*-Mutanten

3.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Zum Studium eines Entwicklungsprozesses bietet ein Modellsystem wie *Arabidopsis thaliana* eine Vielzahl von Vorgehensweisen. Ausgangspunkt für solche Studien sind oft Mutanten, die spezifische Defekte im untersuchten Entwicklungsprozess zeigen. Hat man das defekte Gen identifiziert, können beispielsweise Expressionsstudien oder Interaktionsstudien genauere Informationen über die Funktion des Gens liefern. Dabei gibt es aber limitierende Faktoren, da in Pflanzen viele Prozesse redundant reguliert sind. Ein Funktionsverlust in einem Gen führt nicht zwingend zu einem veränderten Phänotyp, sondern kann durch die Funktion eines anderen Gens ausgeglichen werden. Aspekte von Entwicklungsprozessen können auch so essentiell sein, dass sich der Verlust einer bestimmten Gen-Funktion letal auswirkt. Die mutanten Pflanzen sterben also ab. Diese Faktoren haben zur Folge, dass bei einer einfachen Suche nach Entwicklungsmutanten nur eine begrenzte Anzahl gefunden werden kann.

Ist man aber im Besitz einer interessanten Entwicklungsmutante, lässt sich diese als Ansatzpunkt zur Identifizierung weiterer an dem Prozess beteiligter Gene einsetzen.

In dieser Arbeit wurde die *las-4*-Mutante als Ausgangspunkt zur Isolierung weiterer, an der Initiation von Lateralmeristemen beteiligter Loci verwendet. Zu diesem Zweck wurden homozygote *las-4*-Samen chemisch mutagenisiert, M₁-Linien etabliert und die M₂-

Nachkommenschaft auf Pflanzen hin untersucht, die eine Veränderung des *las-4*-Phänotyps zeigten. Dabei sollten einerseits Pflanzen identifiziert werden, die eine Unterdrückung bzw. Abschwächung des *las-4*-Phänotyps zeigten, andererseits sollten Pflanzen identifiziert werden, die einen stärkeren Verlust der Sprossverzweigung aufweisen.

Als Suppressor kann sich beispielsweise ein Gen auswirken, dass von dem mutierten Gen, das Ausgangspunkt für das Experiment bildete, transkriptionell reprimiert wird. Dies ist dann der Fall, wenn der Mutante Phänotyp der Ausgangsmutante auf einer Fehlexpression des zweiten Locus zurückzuführen ist. Ein weiteres Beispiel sind Phänotypen, die durch Anreicherung von Signalstoffen (z.B. Phytohormone) in den Pflanzen hervorgerufen werden, diese können bei Funktionsverlust einer Komponente der involvierten Signaltransduktionskaskade unterdrückt werden.

Eine Verstärkung eines Phänotyps (*enhancer*) kann bei paralleler Aktivität auftreten. Dies ist beispielsweise bei redundanter transkriptioneller Aktivierung von Zielgenen durch mehrere transkriptionelle Aktivatoren zu beobachten. Erst beim Ausschalten beider Transkriptionsfaktoren wird das Zielgen nicht mehr exprimiert.

Wie diese Beispiele belegen, ist einer der Vorteile dieser Strategie, dass die Funktion der in einem *enhancer-/Suppressor*-Screening identifizierten Loci oft eng mit der des Ausgangsgens gekoppelt sind.

3.2.2 Durchführung der Mutagenese

In *Arabidopsis* stehen verschiedene experimentelle Ansätze zur Erzeugung von Mutationen zur Verfügung. Grundsätzlich unterscheidet man dabei zwei Methoden.

Erstens ist es möglich, Mutationen durch Insertionsmutagenese zu erzeugen. Hierbei ist der Aufwand, eine Population ausreichender Größe zu erzeugen, relativ groß. Hat man aber eine interessante Mutante entdeckt, kann durch Sequenzierung der flankierenden Sequenzen des Transgens oder Transposons schnell der verantwortliche Locus identifiziert werden. Wegen des hohen Aufwands bei der Etablierung der Linien macht ein solcher Ansatz vor allem Sinn, wenn die erzeugte Population mehrfach, mit unterschiedlichen Suchkriterien durchmustert wird.

Zweitens können Mutationen durch Chemikalien oder Strahlung, die Modifikationen an der DNS induzieren erzeugt werden. Im Gegensatz zur Insertionsmutagenese ist der Aufwand, eine große Population zu erzeugen, sehr gering. Allerdings ist die Identifizierung eines

interessanten Locus wesentlich aufwendiger als beim oben beschriebenen Ansatz. Das Gen muss in einem kartierungsgestützten Ansatz isoliert werden, was allerdings durch die Verfügbarkeit der Genomsequenz von *Arabidopsis* erleichtert wird. Ein entscheidender Vorteil ist, dass es sich bei den erzeugten Mutationen um Punktmutationen handelt. Je nach Ort der Mutation können unterschiedlich starke Phänotypen erzeugt werden. Dadurch können auch Mutanten für Gene gefunden werden, die sich bei vollständigem Funktionsverlust letal auswirken. Dagegen führt die Insertion eines Transgens in den meisten Fällen zu einem völligen Funktionsverlust des Gens.

In dieser Arbeit wurde der chemische Mutagenese-Ansatz gewählt. Als Mutagen diente Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS). Nach der Behandlung von etwa 5000 Samen von homozygoten *las-4*-Pflanzen mit 0,3% EMS wurden diese ausgesät.

Die M₁-Generation wurden angezogen und einzeln abgeerntet. Dies bedeutet mehr Arbeit gegenüber einer *Pooling*-Strategie, bietet aber auch Vorteile. Findet man in der M₂-Generation einer M₁-Pflanze einen interessanten Phänotyp mehrfach, ist es wahrscheinlich, dass es sich um das selbe mutante Allell handelt. Identifiziert man diese interessanten Mutanten in einer Population, in der alle Samen der M₁-Generation gemeinsam abgeerntet wurden, muss erst durch Kreuzung auf Allelie getestet werden. Ausserdem erleichtert es, heterozygote Schwesterpflanzen zu identifizieren, falls die isolierten Mutanten homozygot nicht fertil sind. Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, ob die Mutagenese erfolgreich war, wurden stichprobenartig M₁-Pflanzen auf helle Sektoren auf Blättern hin überprüft. Diese beruhen auf klonalen Sektoren, in denen durch Mutation Komponenten des Photosyntheseapparates defekt sind. Solche Sektoren wurden bei etwa 1-2 % der Pflanzen gefunden und bestätigten den Erfolg der Mutagenese.

3.2.3 Screening der M₂-Generation

Die eigentliche Suche nach Modifikatoren des *las-4*-Phänotyps wurde in der M₂-Generation durchgeführt. Im Hinblick auf die Strategie sind zwei Faktoren zu beachten.

Zum einen ist es wichtig, genügend Pflanzen aus jeder Linie zu charakterisieren, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, eine interessante Mutante zu entdecken. Dies ist insbesondere wichtig, da die M₁-Pflanzen heterozygot für die in den meisten Fällen rezessiven Mutationen sind. Deshalb ist in der M₂-Generation das Auftreten des Phänotyps nur bei einem Viertel der

Pflanzen zu erwarten. Segregieren in der Linie außerdem noch weitere starke Phänotypen wie Zwergwuchs oder Letalität, erschwert dies die Identifizierung einer Mutante zusätzlich.

Zum anderen ist es erstrebenswert, möglichst viele Linien zu analysieren, da jede Linie von einer unterschiedlichen M₁-Pflanze abstammt und somit unabhängige Mutationen im Genom trägt.

Im *Screening* wurden insgesamt etwa 18.000 M₂-Pflanzen durchmustert. Es handelte sich hierbei um Nachkommen von ca. 1500 M₁-Linien. Dabei wurden Einzelsamen ausgelegt.

Dabei wurden zunächst einmal etwa 16 bis 24 Samen pro M₁-Linie ausgelegt und charakterisiert. Auf diese Weise wurden etwa 500 Linien phänotypisch analysiert. Später wurde eine *Pooling*-Strategie angewendet: Um eine größere Anzahl Linien zu durchmustern, wurden Sub-Pools aus jeweils 10 Linien gebildet. Von jedem dieser Pools wurden ca. 100 Pflanzen ausgelegt und charakterisiert. Die 10 Linien eines Sub-Pools wurden einzeln ausgelegt, wenn mehrere interessante Phänotypen in einem Pool identifiziert wurden. Auf diese Weise sind etwa 1000 Linien charakterisiert worden.

Die Pflanzen wurden für 3-4 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und anschließend zur Blühinduktion in Langtagbedingungen überführt. Die mehrwöchige Kurztagphase verlängert die vegetative Wachstumsphase was eine größere Zahl an Rosettenblättern zur Folge hat. Dies sollte insbesondere das Identifizieren eines Suppressors von *las-4* erleichtern. Beim Durchsehen der M₂-Generation wurden sowohl Kandidaten mit einem Suppressor- als auch mit einem *Enhancer*-Phänotyp identifiziert.

Diejenigen Pflanzen, die im Gegensatz zu *las-4* Seitentriebe aus der Rosette bildeten –also die potenziellen Suppressoren- wurden zunächst einmal mit dem CAPS-Marker mTest_*las-4* auf Anwesenheit des *las-4*-Deletionsallels getestet. Es stellte sich heraus, dass es sich bei allen identifizierten Kandidaten um eine Wt-Kontamination handelte. Die mögliche Erklärung dafür liegt in der M₁-Generation. Da die verwendeten 96-Loch Auslegeshalen mehrfach verwendet werden, könnten trotz der Reinigung Wildtyp-Samen an den Schalen zurückgeblieben sein. Möglicherweise kann auch eine Querbestäubung stattgefunden haben, falls blühende Wildtyp-Pflanze eng neben M₁-Pflanzen gestanden haben.

Daraufhin wurde die Suche nach Suppressoren in dieser Population nicht fortgeführt. Im Rahmen einer anderen Doktorarbeit wurde eine erneute EMS-Mutagenese mit Samen von *max2-1/las-4*-Doppelmutanten (Abschnitt 3.1.4.) durchgeführt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Mutanten isoliert, die im Vergleich zu *las-4* eine stärkere Unterdrückung der Seitentriebbildung zeigen. Aus 55 unabhängigen Linien, die diesen Phänotyp zeigten, wurden vier unabhängige, bei wiederholtem Auslegen stabile

Mutanten, genauer charakterisiert. Sie erhielten die Bezeichnung *enhancer of las-4* (*eol*). Diese *enhancer* zeichnen sich dadurch aus, dass sie keine bzw. deutlich weniger Seitentriebe aus Stängelblättern bilden. Das Schema in Abbildung 3.14. vermittelt einen Eindruck über die gefundenen Phänotypen. Während *las-4* (*links*) keine Seitentriebe aus Rosettenblättern bildet, wohl aber aus Achseln von Stängelblättern, bilden die *enhancer* entweder Seitentriebe nur aus den oberen Stängelblättern oder gar keine.

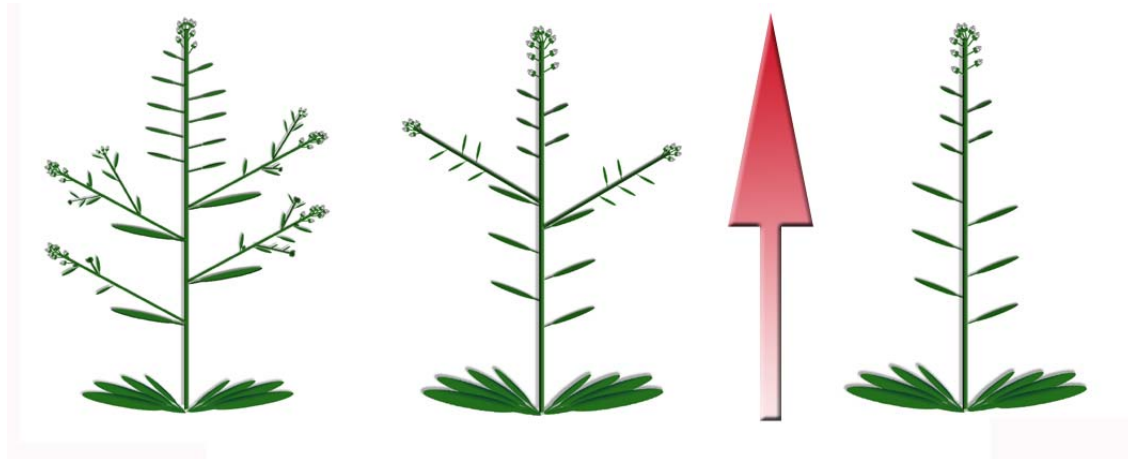


Abbildung 3.14.: Schematischer Vergleich des Verzweigungsmusters von *las-4* und den im Screening identifizierten *enhancer*-Mutanten. Dargestellt ist *las-4* (**links**), eine schwache *enhancer*-Mutante (**Mitte**) und eine starke *enhancer*-Mutante (**rechts**). Der rote Pfeil deutet an, dass bei schwachen *enhancern* jeweils nur die oberen Stängelblätter Seitentriebe bilden.

Wie in den folgenden Abschnitten beschrieben, hängt das Auftreten des Phänotyps bei *eol3/las-4*, *eol5/las-4* und *eol6/las-4* von der Anzucht unter Kurztagbedingungen ab. *eol1/las-4* zeigte einen Phänotyp unter Kurz- und Langtagbedingungen, ist aber spätblühend unter Langtagbedingungen. Als Kontrollexperiment wurde geprüft, welchen Phänotyp *las-4* selbst unter diesen Wachstumsbedingungen hat. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 3.15 illustriert.

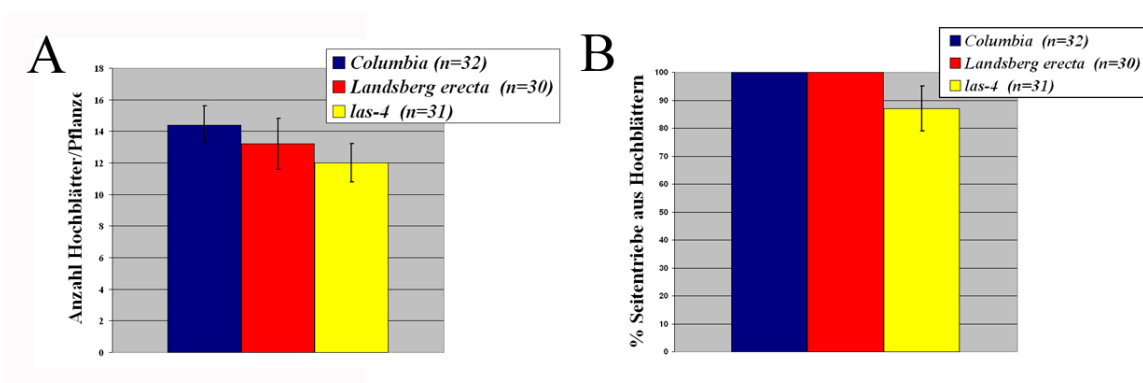


Abb.3.15.: Verzweigungsmuster von *las-4*, Columbia und Landsberg *erecta* unter Kurztagbedingungen. **A:** Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl an Stängelblättern, die jede Pflanze bildet. In **B** ist dargestellt, in wie viel Prozent der Stängelblätter die Pflanze Seitentriebe anlegt. Weitere Informationen im Text.

In Abbildung 3.15.A ist die Anzahl an Stängelblättern aufgeführt, die durchschnittlich pro Pflanze angelegt werden. Dabei fällt auf, dass *las-4* tendenziell weniger Blätter anlegt als die Wildtypen Columbia und Landsberg *erecta*. Allerdings ist der Unterschied nur gering und die Anzahl der Stängelblätter unterliegt leichten Schwankungen. Ein eindeutiger Effekt ist aber in Diagramm 3.15.B zu sehen. Während in Columbia und Landsberg *erecta* Pflanzen in allen untersuchten Pflanzen jedes Stängelblatt einen Seitentrieb bildete, fanden sich in *las-4* durchschnittlich nur in etwa 87 % der Stängelblätter Achselsprosse. Interessanterweise waren in Analogie zu den *eol*-Phänotypen immer die untersten Stängelblätter betroffen. Allerdings zeigt ein Vergleich mit der Beschreibung der Phänotypen in den folgenden Kapiteln, dass diese deutlich stärker und somit nicht zu verwechseln sind.

3.2.4 Charakterisierung der 4 Kandidaten

Zunächst einmal wurden Nachkommen der gefundenen Kandidaten erneut ausgelegt, um zu überprüfen, ob der jeweilige Phänotyp genetisch stabil in die M₃-Generation vererbt wird.

Dabei stellten sich vier unabhängige Linien mit einem bei wiederholten Auslegen stabilen und starken Phänotyp heraus.

Im folgenden wird die weitere Vorgehensweise bei der Charakterisierung der 4 Kandidaten beschrieben.

Da bei der Behandlung mit EMS in jeder Linie viele Mutationen erzeugt werden, muss in Rückkreuzungen erst einmal gezeigt werden, ob der Phänotyp von einem einzigen mutierten Locus ausgelöst wird.

Bei einem *Screening* für Modifikatoren nimmt man dafür die Ausgangsmutante, also im vorliegenden Fall *las-4*. Handelt es sich um einen einzelnen Locus, erwartet man in der F₂-Generation der Rückkreuzung eine 3 : 1 Aufspaltung des Phänotyps, bei zwei beteiligten Genen sollte nur jede 16. Pflanze den Phänotyp zeigen.

Ein weiteres wichtiges Experiment ist die Auskreuzung der Hintergrundmutation (*las-4*), um nachzuweisen ob die *enhancer*-Mutation auch alleine einen Phänotyp zeigt. Dazu wurden Columbia-Pflanzen verwendet.

Außerdem wurden noch Kreuzungen unternommen, die eine molekulare Kartierung der Loci ermöglichen sollte. Dazu wurde Landsberg *erecta* ausgewählt, da die Mutation in einem Columbia Hintergrund erzeugt wurde. Es sind eine Vielzahl an DNS-Polymorphismen zwischen beiden Ökotypen bekannt. Ein weiterer Vorteil ist, dass umfangreiche Informationen über molekulare Marker in der *Arabidopsis* Datenbank (TAIR) öffentlich zugänglich sind. Sie können durch molekulare Marker sichtbar gemacht werden.

3.2.4.1 Phänotypische Charakterisierung von *eol1/las-4*-Pflanzen

Wie bereits beschrieben, zeichnen sich die 4 unabhängigen *eol*-Linien durch eine Suppression der Seitenspross-Bildung aus den Achseln der meisten Stängelblätter aus. Wie in Abbildung 3.16. gezeigt, weisen *eol1/las-4*-Pflanzen noch weitere phänotypische Veränderungen auf. Die Habitusaufnahme (Abb.3.16.A) zeigt, dass die Pflanzen eine reduzierte Verzweigung und eine gestörte Phyllotaxis der Stängelblätter aufweisen. In der Nahaufnahme der Infloreszenz (Abb.3.16.B) ist außerdem zu erkennen, dass eine Blüte 6 Petalen zeigt (rote Pfeilspitze). Dieser Phänotyp wurde nur in einem geringen Teil der Blüten vorgefunden. In Abbildung 3.16.C. ist die Großaufnahme mehrerer Stängelblätter am Hauptspross dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Länge der Internodien variiert und die Blattstellung gestört ist. Außerdem fiel auf, dass der Blattansatz am Hauptspross in mehreren Fällen nicht waagrecht verlief, sondern diagonal und dadurch die Blattoberfläche dieser Stängelblätter schräg zum Hauptspross steht (Pfeil).

Die *eol1*-Mutation wurde zwei mal gegen *las-4* zurückgekreuzt, um zusätzliche Mutation aus dem Hintergrund zu entfernen. In der F₂-Generation der 2. Rückkreuzung spalteten in einer Population aus 52 Pflanzen 41 *las-4* und 11 *eol1/las-4*-Phänotypen auf. Dies entspricht einer 3:1 Segregation (Erwartung: 39 : 13), also ist es wahrscheinlich, dass ein einzelner Locus den Phänotyp von *eol1* im *las-4*-Hintergrund verursacht. Bei einer Auskreuzung von *las-4* zeigten konnte bei *eol1*-Mutanten mit deutlichem Eigenphänotyp identifiziert werden.

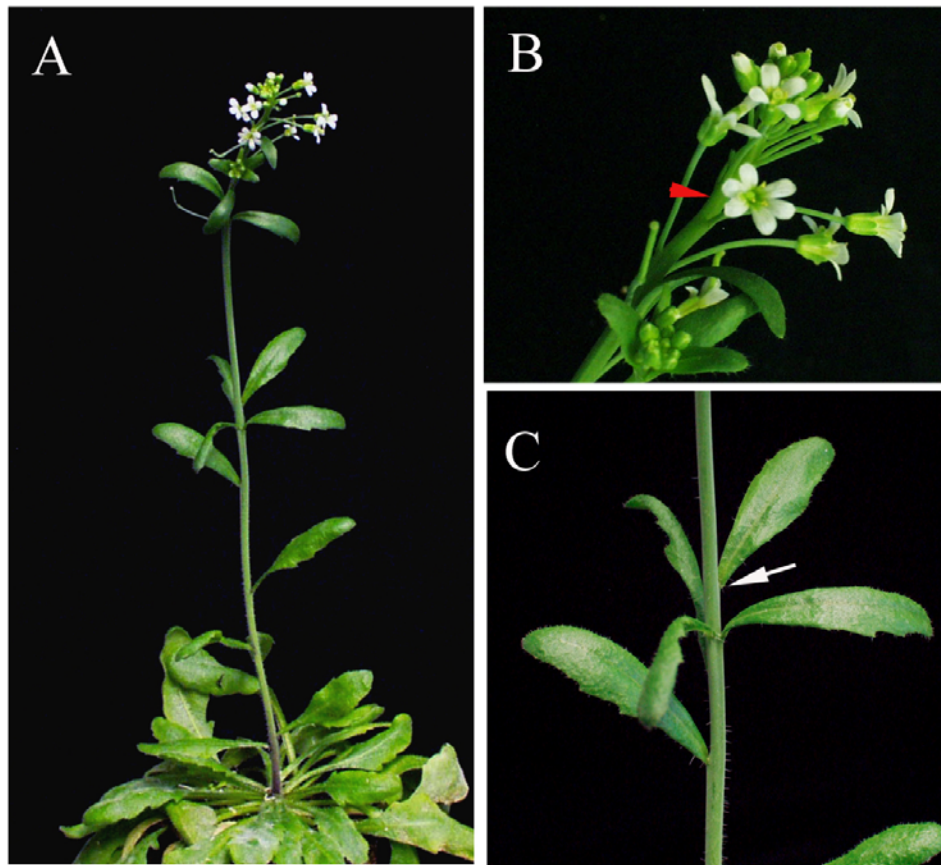


Abb.3.16.: Phänotypische Beschreibung von *las-4/eoll*. **A:** Habitusaufnahme von *eoll/las-4*. **B:** Nahaufnahme einer Infloreszenz. Die rote Pfeilspitze markiert eine Blüte mit 6 Petalen. **C:** Nahaufnahme von Stängelblättern mit gestörter Phyllotaxis.

Außerdem wurde untersucht, ob das Auftreten des Phänotyps von der Dauer der Lichtphase während der Anzucht abhängt. Eine Besonderheit von *eoll* ist, dass die Pflanzen zeitlich später als Wildtyp-Pflanzen zu blühen beginnen. Die Diagramme in Abbildung 3.17. zeigen das Verzweigungsmuster von *eoll* aus Stängelblättern unter Lang- und Kurztagbedingungen. In Abbildung 3.17.A ist die Anzahl der pro Pflanze gebildeten Stängelblätter dargestellt. *Eoll* Pflanzen bilden unter Langtagbedingungen durchschnittlich 5,7 Stängelblätter, unter Kurztagbedingungen dagegen mit 8,7 deutlich mehr. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Pflanzen unter Kurztagbedingungen eine längere vegetative Phase durchlaufen. Der Anteil an Blattachsen mit Seitensprossen ist im Diagramm 3.17.B gezeigt. *eoll*-Pflanzen produzieren im Langtag Seitentriebe aus durchschnittlich 36 % der Blattachsen, im Kurztag nur etwa aus 10 %. Die großen Fehlerbalken machen aber deutlich, dass bei beiden Messungen eine grosse Varianz vorgefunden wurde. Man kann aber von einem *enhancer*-Effekt unter Lang- und Kurztagbedingungen sprechen.

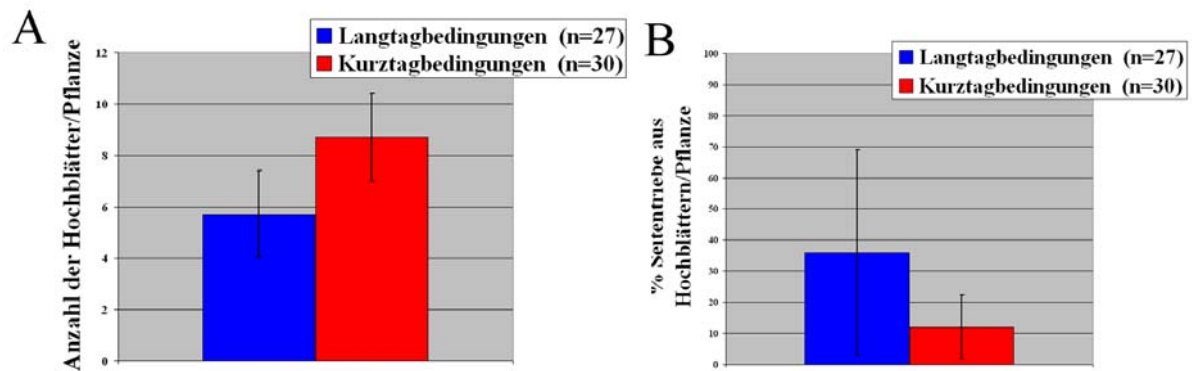


Abb.3.17.: Vergleich der Bildung von Achselsprossen aus Stängelblättern von *eol1/las-4* Pflanzen unter Langtag- und Kurztagbedingungen. **A:** Anzahl Stängelblätter pro Pflanze. **B:** % Stängelblätter mit Seitentrieben. Weitere Erläuterung im Text.

Zusammenfassend kann man sagen, dass *eol1* unter Lang- und Kurztagbedingungen keine Seitentriebe aus den Achseln der meisten Stängelblätter bildet. Außerdem wurde eine gestörte Phyllotaxis festgestellt sowie eine abweichende Anzahl Petalen in einem Teil der Blüten.

3.2.4.2 Phänotypische Charakterisierung von *eol3/las-4*-Pflanzen

eol- Pflanzen zeigen einen starken *enhancer*-Phänotyp. Der Vergleich zwischen *las-4* (Abb.3.18. links) und *las-4/eol3* macht deutlich, dass in der *enhancer*-Linie die Anlage von Seitentrieben praktisch völlig unterdrückt ist. Eine Nahaufnahme des Hauptsprosses ist in Abbildung 3.18.B zu sehen. Die Pfeile markieren leere Achseln von Stängelblättern. Um zu überprüfen, ob in den Blattachseln Initiation von Meristemen stattfindet, wurden SEM-Aufnahmen der Blattachseln von Stängelblättern einer *eol1/las-4*-Pflanze angefertigt (Abb.3.18.E). Es wird deutlich, dass zwischen adaxialer Blattbasis und dem Hauptspross keinerlei Strukturen sichtbar sind, die auf die Anlage eines Meristems hindeuten. Abbildung 3.18.C zeigt die Nahaufnahme einer Infloreszenz. Sie zeigt keinen auffälligen Phänotyp. In Abbildung 3.18.F. sind Rosettenblätter von *eol3/las-4* (links), *las-4* (Mitte) und Columbia (rechts) abgebildet. Der Vergleich zeigt, dass *eol3/las-4*-Rosettenblätter kleiner sind und ein dunkleres grün aufweisen als *las-4*- und Columbia-Blätter.

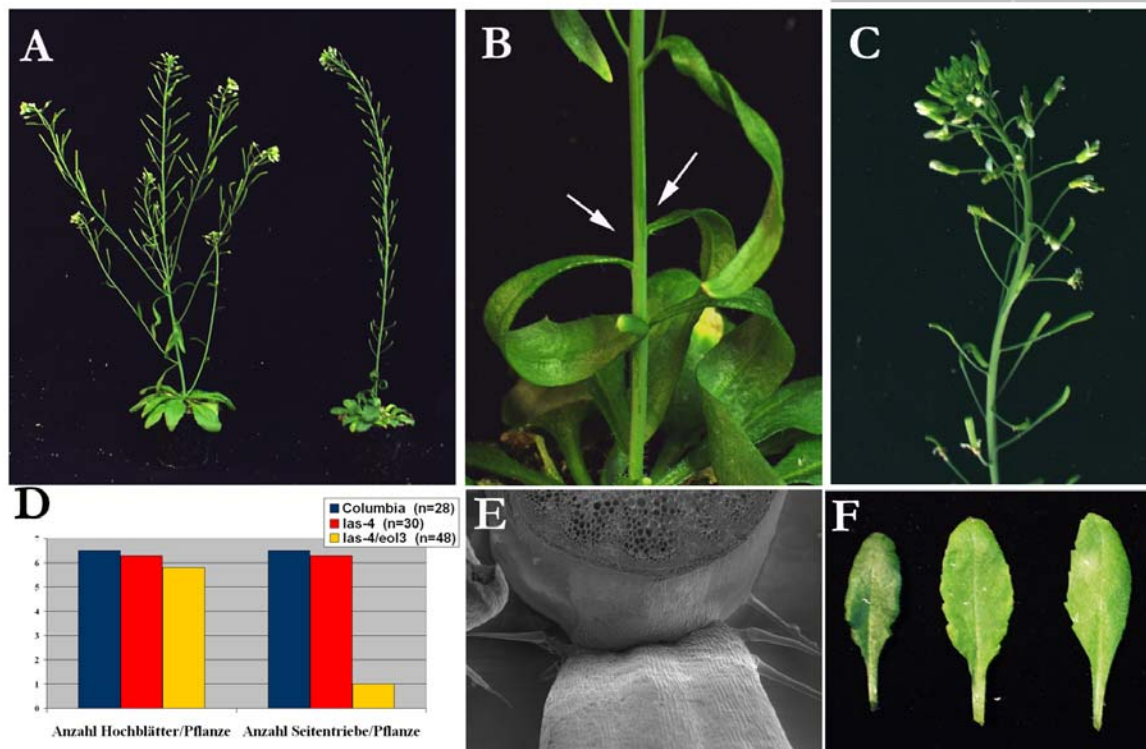


Abbildung 3.18: Phänotypische Charakterisierung von *eol3/las-4*-Pflanzen. **A:** Habitus von *las-4* (links) und *eol3/las-4* (rechts). **B:** Nahaufnahme des Hauptsprosses, die Pfeile markieren leere Blattachsen von Stängelblättern. In **C** ist die Infloreszenz von *eol3/las-4*-Pflanzen gezeigt. **D:** Das Diagramm stellt die Anzahl Stängelblättern und Seitentrieben aus Stängelblättern in Columbia, *las-4* und *eol3/las-4* dar. **E:** SEM-Aufnahme der Blattachsel eines *eol3/las-4*-Stängelblattes. **F:** Vergleich der Blattgrößen von *eol3/las-4*, *las-4* und Columbia (v.l.n.r.). Weitere Angaben im Text

Außerdem illustriert das Diagramm in Abbildung 3.18.D die durchschnittliche Anzahl gebildeter Stängelblätter pro Columbia-, *las-4*- und *eol3/las-4*-Pflanze und zeigt außerdem die Zahl der Stängelblätter, die einen Seitentrieb anlegen. Dabei fällt auf, dass sich bei allen drei Gruppen die Zahl der Stängelblätter kaum voneinander abweicht. Das Diagramm zeigt des Weiteren, dass Columbia und *las-4* aus jeder Blattachsel Seitentriebe bilden während *eol3/las-4*-Pflanzen durchschnittlich nur in einer von 6 Blattachsen einen Trieb anlegen. Falls Seitensprosse gebildet werden, handelt es sich immer um die obersten Stängelblätter.

Es wurde eine Rückkreuzung einer *eol3/las-4*-Pflanze mit *las-4* durchgeführt. In der F₂-Generation wurden unter 29 Pflanzen 5 *eol3*-Phänotypen gefunden. Dies bestätigt, dass es sich nur um einen Locus handelt, da dies einer 3:1 Aufspaltung (Erwartung 22 : 7) ähnelt.

eol3/las-4-Pflanzen (F₂-Generation der Rückkreuzung mit *las-4*), die für 14 Tage unter Kurztagbedingungen angezogen und dann zur Blühinduktion in den Langtag überführt wurden zeigten anschließend keinen *enhancer* Phänotyp. Ließ man Pflanzen der selben Linie für 28 Tage im Kurztag, spalteten wenige Pflanzen mit einem *enhancer*-Phänotyp auf, nach 35 Tage waren es deutlich mehr Pflanzen. Dies verdeutlicht, dass der *eol3*-Phänotyp erst

Auftritt, wenn die Pflanzen eine Mindestdauer von etwa 4 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen wurden.

Wie die Auswertung der Mapping-Population zeigt (Abschnitt 3.2.8.2.), sind alle Pflanzen mit *eol3*-Phänotyp in der F₂-Generation der Kartierungspopulation auch homozygot für *las-4*. Es ist nicht auszuschließen, dass die *eol3*-Mutation ohne *las-4*-Hintergrund einen schwachen Phänotyp erzeugt, aber der in Abb.3.18 A (rechts) gezeigte starke Phänotyp kommt nur bei einer Kombination von *las-4* und *eol3* zustande.

3.2.4.3 Phänotypische Charakterisierung von *eol5/las-4*-Pflanzen

Eine weitere Mutante, die in Kombination mit *las-4* einen starken Phänotyp erzeugt ist *eol5*. Der Phänotyp einer *eol5/las-4*-Pflanze ist in Abbildung 3.19 gezeigt. *eol5/las-4* weist neben dem Verzweigungsphänotyp noch schmale, dunkelgrüne Blätter auf. Die Auskreuzung von *las-4* ergab in der F₂-Generation, dass keine Pflanze ohne *las-4*-Hintergrund einen Verzweigungsphänotyp zeigte. Folglich ist *eol5* ein reiner Verstärker des *las-4*-Phänotyps ohne eigenen Verzweigungsphänotyp.



Abb. 3.19.: Phänotyp einer *eol5/las-4*-Pflanze. Weitere Erläuterungen im Text.

In Abbildung 3.20 ist das Ergebnis eines Experimentes gezeigt, dass prüfen sollte, in wieweit der *eol5*-Phänotyp von den Lichtbedingungen während der Anzucht abhängt. Zu diesem Zweck wurden Nachkommen der selben Linien unter Kurztagbedingungen angezogen. Es handelte sich um die F₂-Generation der 1. Rückkreuzung von *eol5* mit *las-4*. Alle Pflanzen sind homozygot für *las-4* und für *eol5* segregierend.

Im Abstand von jeweils 7 Tagen wurde ein Teil der Pflanzen zur Blühinduktion in den Langtag überführt (Abb.3.20.A-F). Später wurde dann für alle Pflanzen die Zahl der Seitentriebe aus Stängelblättern bestimmt. Die Angaben beschreiben, aus wie viel Prozent der Stängelblätter jede Pflanze Triebe bildet. Außerdem wurden als Kontrolle noch *las-4*- (Abb.3.20.G) und Columbia-Pflanzen (Abb.3.20.H) für 45 Tage unter Kurztagbedingungen angezogen und anschließend wie die *eol5*-Linie ausgewertet. Bei der *las-4*-Kontrolle handelt es sich um eine homozygote Linie, die nicht aufspaltet.

Die Columbia Pflanzen, die für 45 Tage unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, bildeten aus den Achseln aller Stängelblätter Seitentriebe. Wie bereits in Abb.3.15.B in einer anderen Darstellungsform gezeigt, ist unter diesen Bedingungen bei einem Teil der *las-4*-Pflanzen die Anlage von Seitentrieben in manchen Achseln von Stängelblättern unterdrückt.

Betrachtet man sich die segregierenden *eol5*-Linien unter den verschiedenen Anzucht-Bedingungen ist zu beobachten, dass nach 7 und 14 Tagen Aufenthalt unter Kurztagbedingungen noch alle Blattachsen von Stängelblättern Triebe anlegen. Bei den *eol5/las-4*-Linien, die anfangs für 21 Tage im Kurztag waren, bildete eine kleinere Gruppe von Pflanzen nur Seitentriebe aus 70-90% der Blattachsen. Einzelne Pflanzen legten nur in 30-50% der Blattachsen Triebe an, der Rest aus 90-100%. (Abb. 3.20.C). Eine Verstärkung dieser Tendenz zeigt das Diagramm der Pflanzen, die Anfangs für 28 Tage im Kurztag waren (Abbildung 3.20.D). Erst bei den Pflanzen, die für 35 Tage im Kurztag waren spalten einzelne Pflanzen auf, die in keiner der Blattachsen Triebe anlegen (Abb. 3.20.E). Bei 42 Tagen Anzucht im Kurztag (Abb.3.20.F) sind es 4 Pflanzen, die 0-10% Seitentriebe anlegen, und 4 Pflanzen, die aus etwa 11-20 % der Blattachsen Triebe machen. Viele Pflanzen haben nur einen Teil der Stängelblätter ohne Seitentriebe. Nur 10 von 39 Pflanzen machen 90-100% Seitentriebe. Man kann hier nicht von einer klaren Segregation sprechen. Bei 39 F₂-Pflanzen und einer erwarteten 3 : 1 Aufspaltung des *eol5*-Phänotyps, hätte man etwa 10 *eol5*-Phänotypen und 29 *las-4*-Phänotypen erwartet. Vergleicht man dieses Ergebnis mit der *las-4* Kontrolle (Abb. 3.20.G), die ja auch eine leichte Tendenz zur Unterdrückung von Seitentrieben zeigt, sind die Pflanzen mit 40-70 Seitentrieben nicht zu erklären. Eine mögliche Erklärung ist, dass es sich bei den 8 Pflanzen mit Seitentrieben aus 0-20 % der Stängelblätter um homozygote *eol5*-Pflanzen handelt und bei den Pflanzen mit schwachem Verzweigungsphänotyp um heterozygote *eol5*-Pflanzen handelt. In diesem Fall würde sich *eol5* im *las-4*-Hintergrund dosisabhängig verhalten. Die Analyse der F₁-Generation des Allelie-Testes (Abschnitt 3.2.5.) unterstützt diese Hypothese.

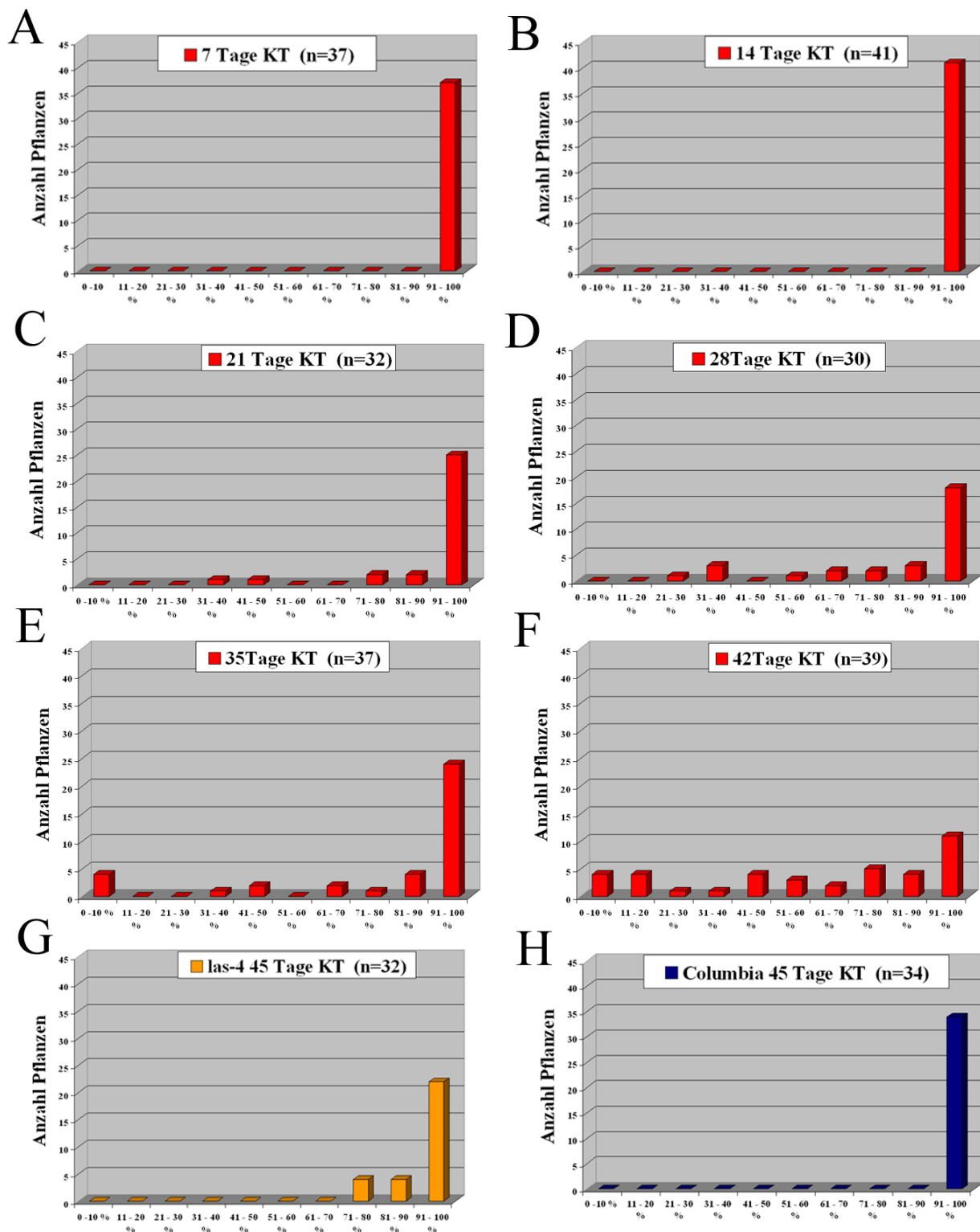


Abbildung 3.20.: Diagramme zur Darstellung der Anlage von Seitentrieben aus Stängelblättern bei *eol5/las-4*-Pflanzen unter verschiedenen Lichtbedingungen. In den Diagrammen A-H ist jeweils die Anzahl Pflanzen der Menge an Seitentrieben aus Stängelblättern zugeordnet. A-F zeigen dieselbe segregierende *eol5/las-4*-Linie, die zuerst im Kurztag angezogen und anschließend zur Blühinduktion in den Langtag überführt wurde. Die Pflanzen waren für 7 Tage (A), 14 Tage (B), 21 Tage (C), 28 Tage (D), 35 Tage (E) und 42 Tage (F) unter Kurztagbedingungen. G: *las-4* Pflanzen, für 45 Tage unter Kurztagbedingungen. H: Columbia-Pflanzen, für 45 Tage unter Kurztagbedingungen angezogen. Weitere Erläuterungen im Text.

Zusammenfassend kann man sagen, dass *eol5* ein *enhancer* des *las-4*-Phänotyps ist, der keinen eigenen Verzweigungsphänotyp hat. Der Phänotyp von *eol5/las-4*-Pflanzen tritt nur auf, wenn die Pflanzen für mindestens 4-5 Wochen im Kurztag angezogen wurden.

3.2.4.4 Phänotypische Charakterisierung von *eol6/las-4*-Pflanzen

Ähnlich wie die bereits vorgestellten *eol*-Mutanten zeigt auch *eol6*, abgesehen von dem Verzweigungsphänotyp, wenige vom Wildtyp abweichende Charakteristika. Abbildung 3.21 zeigt die phänotypische Charakterisierung von *eol6/las-4*-Pflanzen. Die Habitusaufnahme (Abb.3.21.A) zeigt eine *eol6/las-4*-Pflanze, in der die Anlage von Lateral sprossen in den Achseln der meisten Stängelblätter unterdrückt ist. Die Infloreszenz zeigt keine auffälligen Merkmale (Abb.3.21.B). In Abbildung 3.21.C ist der Hauptspross abgebildet. Der Pfeil markiert die Achsel eines Stängelblattes, in der kein Seitentrieb gebildet wird.

Um zu überprüfen, ob *eol6/las-4*-Pflanzen meristemähnliche Strukturen in der Blattachsel anlegen wurden SEM-Aufnahmen der Achseln von Stängelblättern angefertigt. Bei Betrachtung der Abbildung 3.21.D fällt auf, dass sich zwischen der adaxialen Blattbasis und dem Hauptspross eine abgeflachte Verbindungsstruktur befindet. Die Vergrößerung in Abbildung 3.21.G verdeutlicht dies und zeigt, dass die Oberflächenstruktur von der der Blattoberfläche abweicht. Interessanterweise ist dies bei *eol3*-Pflanzen nicht beobachtet worden (Abb.3.18.E). Die Achsel eines anderen Blattes ist in Abb.3.21.E gezeigt. Hier ist ebenfalls eine Einfurchung zu sehen, die allerdings nicht so ausgeprägt ist wie in Abb.3.21.D. Die Vergrößerung zeigt, dass diese Einfurchung die gesamte adaxiale Blattbasis entlangläuft (Abb.3.21.H). Wie in Abbildung 3.21.F gezeigt, wurden auch Blattachseln ohne diese Struktur gefunden. Die Mehrzahl der analysierten Blattachseln zeigte aber den beschriebenen Phänotyp.

Außerdem ist zu erwähnen, dass *eol6/las-4*-Pflanzen ebenfalls bei Anzucht unter Langtagbedingungen keine reduzierte Verzweigung gegenüber *las-4* zeigen.

In der F₂-Generation der Kreuzung von *eol6/las-4* mit einer Wildtyp-Pflanze konnten nur Wildtyp-Pflanzen, *las-4*-Mutanten und 1/16 *eol6*-Phänotypen gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass *eol6*-Pflanzen nur einen Verzweigungs-Phänotyp im *las-4*-Hintergrund aufweisen.

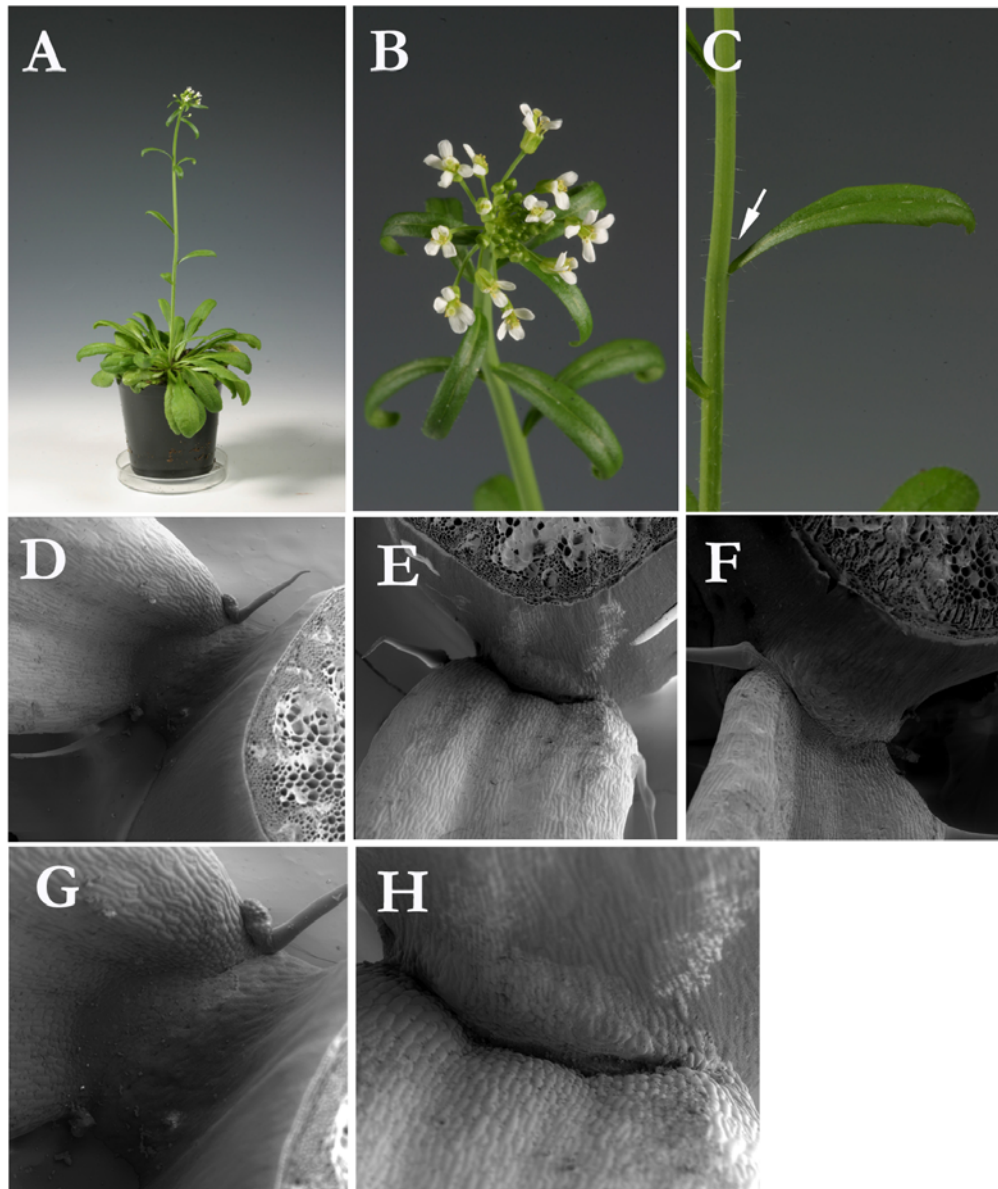


Abb.3.21. Phänotypische Charakterisierung von *eol6/las-4*-Pflanzen. **A:** Habitusaufnahme **B:** Nahaufnahme der Infloreszenz einer *eol6/las-4*-Pflanze. **C:** Hauptspross mit Stängelblatt. Der Pfeil markiert die leere Blattachsel. **D-F :** SEM-Aufnahmen von *eol6/las-4*-Blattachsen. **G:** Vergrößerung von D. **H:** Vergrößerung von E. Weitere Erläuterungen im Text.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die *eol6*-Mutation den *las-4*-Phänotyp verstärkt. Die Mutation hat keinen eigenen Phänotyp. SEM-Aufnahmen zeigten, dass keine meristemähnlichen Strukturen an der Blattbasis gebildet werden. Es wurden Einfurchungen entlang der adaxialen Blattbasis beobachtet.

3.2.5 Allelie-Test

Um nachzuweisen, ob es sich bei den vier näher charakterisierten *eol*-Mutanten um unabhängige Mutationen im gleichen Gen handelt oder Mutationen in verschiedenen Genen,

wurde ein Allelie-Test durchgeführt. Hierzu wurden Pflanzen der unterschiedlichen *eol*-Linien untereinander gekreuzt und der Phänotyp der F₁-Generation analysiert. Handelt es sich bei den *eol*-Linien um Mutationen in verschiedenen Loci, ist in der F₁-Generation jede Mutation nur heterozygot vorhanden, die Pflanze sollte einen *las-4*-Phänotyp zeigen. Ist die Mutation allelisch, ist bei den F₁-Pflanzen ein *eol*-Phänotyp zu erwarten.

Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen, um einen möglichen *eol*-Phänotyp aufzudecken.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3.11. Zusammengefasst.

		Linie	Anzahl Pflanzen	Durchschn. Zahl Stängelblätter	% Seitentriebe
<i>eol1</i>	<i>eol3</i>	A032614	14	8,8 (+/- 1)	79 (+/- 8)
<i>eol1</i>	<i>eol5</i>	A032558	17	9,5 (+/- 1,6)	70 (+/- 14)
<i>eol1</i>	<i>eol6</i>	A032613	12	9,3 (+/- 1,2)	83 (+/- 9)
<i>eol1</i>	<i>eol6</i>	A032559	16	10,8 (+/- 1,3)	94,8 (+/- 5,9)
<i>eol3</i>	<i>eol5</i>	A032560	16	9,9 (+/- 1,1)	81 (+/- 13)
<i>eol5</i>	<i>eol6</i>	A032561	18	9,3 (+/- 1)	81 (+/- 12)

Tabelle 3.11. Auswertung der F₁-Generation des Allelie-Testes. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen. Weitere Erläuterungen im Text.

Die F₁-Generation der Kreuzung *eol1* x *eol3* bestand aus 14 Pflanzen. Mit durchschnittlich 79 % Seitentrieben aus Stängelblättern lag der Wert zwar niedriger als bei *las-4* (87%, Abbildung 3.15), aber deutlich höher als bei den *enhancern of las-4*. Ein ähnliches Ergebnis ergab die Analyse der F₁ der Kreuzung *eol1* x *eol5* (70%) und *eol1* x *eol6* (1.: 83 %; 2.: 94,8 %). Möglicherweise zeigen die Mutationen im heterozygoten Zustand dosisabhängige Phänotypen.

Demnach ist *eol1* nicht allelisch zu *eol3*, *eol5* und *eol6*.

Die F₁-Generation der Kreuzung *eol3* x *eol5* legte in durchschnittlich 81 % der Stängelblätter Seitentriebe an.

eol3 ist nicht allelisch zu *eol1* (s.o.) und *eol5*. Die Kreuzung *eol3* x *eol6* war nicht erfolgreich. Die Nachkommen der Kreuzung *eol5* x *eol6* bildeten durchschnittlich 81% Seitentriebe und waren somit nicht allelisch.

eol5 ist nicht allelisch zu *eol1* (s.o.), *eol3* (s.o.) und *eol6*.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit Ausnahme der nicht getesteten Kombination *eol3* und *eol6* die 4 *eol*-Linien sich nicht allelisch zueinander verhalten. Außerdem wurde leichte Verzweigungsphänotypen festgestellt die möglicherweise auf dosisabhängigen Effekten beruhen.

3.2.6 *las-4* im Landsberg *erecta*-Hintergrund

Außerdem sind verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt worden, die beim Auswerten der Kartierungspopulation von Nutzen sind. Da für die Kartierung eine Kreuzung der *eol*-Linien mit Landsberg *erecta* durchgeführt worden war, wurde geprüft, welchen Einfluss der Landsberg *erecta* Hintergrund unter Kurztagbedingungen auf den *las-4*-Phänotyp selbst hat. Ler trägt die *erecta* Mutation, die die Architektur von Pflanzen beeinflusst (Torii et al., 1996). Zu diesem Zweck wurden mehrere Rückkreuzungen von *las-4* mit Ler Pflanzen durchgeführt. Zwei Pflanzen aus der F₂-Generation der 4. Rückkreuzung von *las-4* in den Ler-Hintergrund sind in Abbildung 3.22. zu sehen. Bei der 4. Rückkreuzung erwartet man einen Anteil Ler-Erbmaterial von über 90 %.

Bei 47 analysierten Pflanzen wurden 32 Wildtyp-Pflanzen und 15 *las-4*-Phänotypen identifiziert. Dies entspricht, beachtet man die relativ kleine Population, annähernd einer 3:1 Segregation (Erwartung 35,25 : 11,75).

Wie in Abbildung 3.22. gezeigt, war bei einem Teil der Pflanzen ein *enhancer*-ähnlicher Phänotyp festzustellen. Abbildung 3.22.A zeigt den Habitus einer *las-4*-Pflanze, die das gleiche Verzweigungsschema wie *las-4* in Columbia-Hintergrund zeigt. In Abb.3.22.B ist die Nahaufnahme eines Stängelblattes mit einem Seitentrieb abgebildet. Die Nahaufnahme der Blattrosette ist in Abb.3.22.C gezeigt. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 3.22. D-F eine *las-4*-Pflanze gezeigt, die einen *enhancer*-ähnlichen Phänotyp zeigte. Die Habitusaufnahme verdeutlicht bereits, dass die meisten Blattachsen leer sind. Lediglich das oberste Stängelblatt bildete einen Seitentrieb. Die Abbildungen E und F zeigen Stängelblätter bzw. Rosettenblätter dieser Pflanze. Die Pfeile markieren jeweils leere Blattachsen.

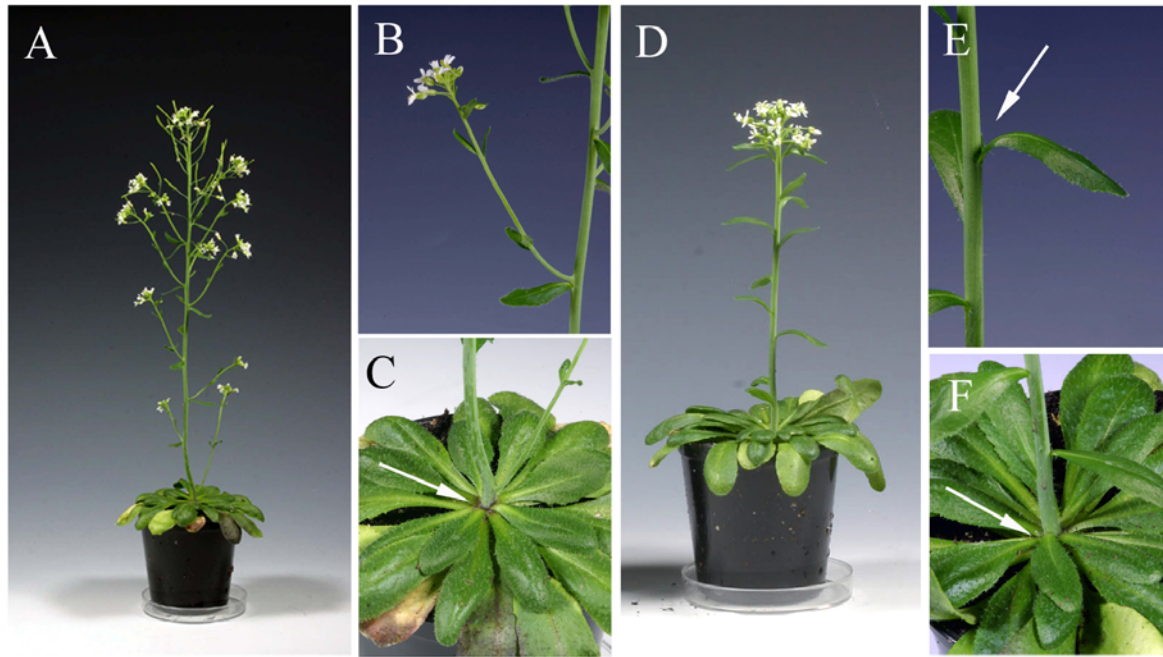


Abb.3.22. Rückkreuzung von *las-4* in Landsberg *erecta*-Hintergrund unter Kurztagbedingungen. **A,B,C** zeigt eine *las-4*-Pflanze mit gleichem Verzweigungsmuster wie *las-4* in Columbia-Hintergrund. Die Stängelblätter (**B**) bilden Seitentriebe C: Die Pflanzen legten keine Achseltriebe in der Rosette an. Dagegen legt die *las-4*-Pflanze, die in **D,E,F** abgebildet ist, in den meisten Blattachseln keine Seitentriebe an. **D**: Habitusaufnahme. Der Pfeil in **E** (Stängelblätter) und **F** (Rosettenblätter) markiert leere Blattachseln.

Abbildung 3.23. stellt das Ergebnis der genaueren Charakterisierung der analysierten Pflanzen dar. A zeigt die Zahl der Stängelblätter. Wie in Abschnitt 3.2.3. bereits gezeigt bildet *las-4* tendenziell weniger Stängelblätter als die Wildtyp-Pflanzen.

Das Diagramm in Abb.3.23.B verdeutlicht einen klaren Einfluss des Landsberg *erecta* Hintergrundes auf das *las-4*-Verzweigungsmuster. Während die Wildtyp-Pflanzen in allen Blattachseln von Stängelblättern Seitensprosse produzierten, konnten bei *las-4*-Pflanzen nur bei durchschnittlich etwa 60 % der Blattachseln Seitensprosse festgestellt werden. Dabei ist aber eine starke Variabilität festgestellt worden, die sich in der Standardabweichung von über 20 % widerspiegelt. Es konnte keine Pflanze gefunden werden, die keinen Seitentrieb anlegte, allerdings gab es 2 Pflanzen, die lediglich aus dem obersten Stängelblatt einen Trieb bildeten. Wie in Abb.3.15.B gezeigt, produzieren *las-4*/Columbia-Pflanzen aus durchschnittlich 87 % der Achseln von Stängelblättern Seitensprosse.

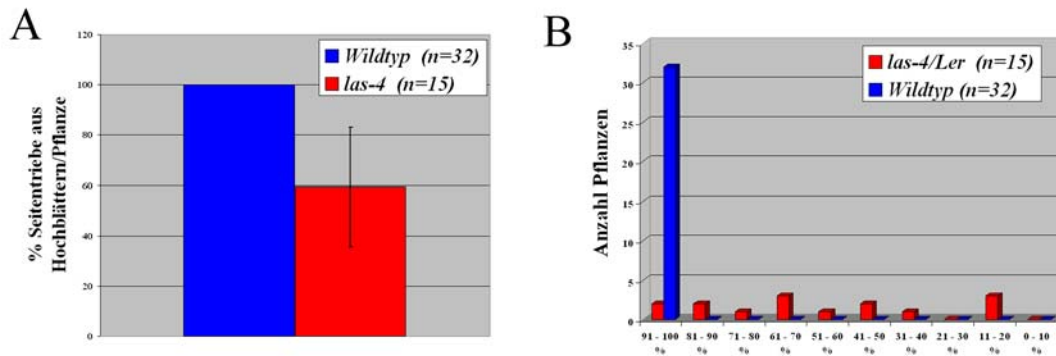


Abbildung 3.23. Auswertung des Verzweigungs-Phänotyps der 4. Rückkreuzung von *las-4* in den Ler-Hintergrund. **A:** Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl von Stängelblättern pro Wt und *las-4*-Pflanze. **B:** Anteil Stängelblätter mit Seitentrieben bei Wildtyp und *las-4/Ler*.

Dieses Experiment zeigt, dass Loci aus dem Landsberg *erecta*-Hintergrund einen *enhancer*-ähnlichen Einfluss auf das *las-4*-Verzweigungsmuster haben. Dieses Ergebnis hat einen großen Einfluss auf die Auswertung der Kartierungspopulation, die ja aus einer Kreuzung aus *eol*-Pflanzen und einer Landsberg *erecta*-Pflanze hervorgeht. Es stellt sich die Frage, ob in der Kartierungspopulation aufgrund von Ler-Hintergrundeffekten Pflanzen, die genotypisch homozygot für *las-4* nicht aber für den *enhancer* sind, phänotypisch fälschlich als *enhancer* klassifiziert werden könnten. Um diese Gefahr zu evaluieren wurde die F₂-Generation der Kreuzung *las-4* mit *ag-1* einbezogen. Da sich *las-4* im Columbia und *ag-1* im Ler-Hintergrund befinden, sind die *las-4*-Mutanten der F₂-Generation in einem vergleichbaren genetischen Hintergrund wie in der F₂ der Kartierungspopulation. Das Ergebnis ist im Kapitel 3.2.7. beschrieben.

3.2.7 *ag-1/las-4*-Kreuzung

Wie in Kapitel 3.2.6. dargestellt verstärkt der genetische Ler-Hintergrund den Phänotyp der *las-4*-Mutante in ähnlicher Weise wie die *eol*-Loci. Da die Kartierungspopulation aus einer Kreuzung von *eol3/las-4* mit einer Landsberg *erecta*-Pflanze hervorgeht, musste ausgeschlossen werden, dass die Auswertung der Kartierungspopulation fehlerhaft werden könnte. Im Unterschied zu der im vorigen Kapitel beschriebenen 4. Rückkreuzung von *las-4* mit *Ler*, die einen Anteil an *Ler*-DNA von über 90% haben sollte, ist dieser in der Kartierungspopulation mit theoretisch 50% wesentlich niedriger. Deshalb wurde die F₂-Population der bereits in Abschnitt 3.1.10. besprochenen Kreuzung *las-4* mit *ag-1* hinzugezogen. Da *las-4* in einem Columbia- und *ag-1* in einem Ler-Hintergrund ist, findet

man in der F₂-Generation eine ähnliche Situation wie in der F₂ der Kartierungspopulation. Deshalb wurde diese F₂-Generation unter Kurztagbedingungen angezogen. Abbildung 3.24. illustriert das Resultat dieser Untersuchung.

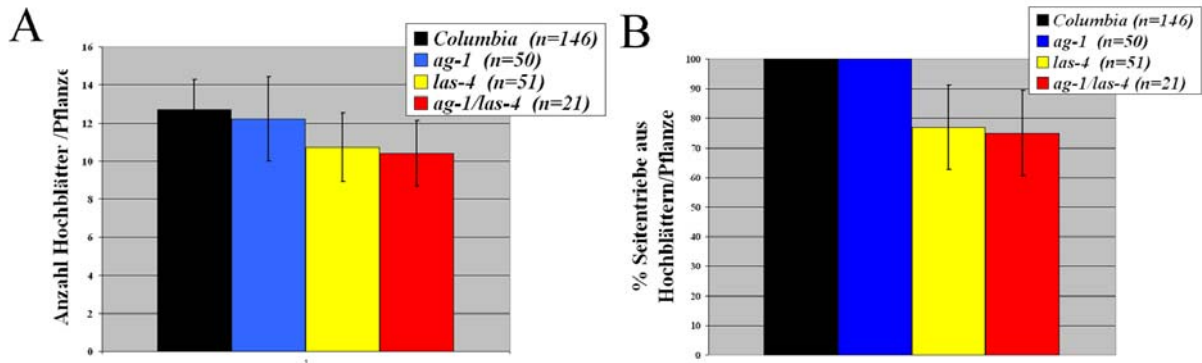


Abb.3.24. Phänotypische Auswertung der F₂-Generation der Kreuzung *ag-1* und *las-4*. **A:** Durchschnittliche Anzahl an Stängelblättern pro Pflanze an Columbia, *ag-1*, *las-4* und *ag-1/las-4*-Pflanzen. In **B** ist die durchschnittliche Anzahl an Stängelblättern angegeben, die einen Seitentrieb anlegen. Weitere Erläuterungen im Text.

Das Diagramm in Abbildung 3.24.A stellt die durchschnittliche Anzahl an Stängelblättern, die pro Pflanze gebildet werden dar. Ein Vergleich zwischen Columbia, *las-4*, *ag-1* und *ag-1/las-4* zeigt, dass alle Phänotypgruppen ähnlich viele Stängelblätter haben. Allerdings bildet *las-4*, ähnlich wie bei der Auswertung für *las-4* unter Kurztagbedingungen (Abb.3.15) etwas weniger Stängelblätter. Die Doppelmutante verhält sich dabei wie die *las-4*-Mutante. Die durchschnittliche Anzahl an Stängelblättern, die je Pflanze einen Seitentrieb anlegen, ist in Abbildung 3.24.B gezeigt. Wildtyp und *ag-1* produzieren aus jedem Stängelblatt einen Spross. *las-4*- und *ag-1/las-4*-Pflanzen verhalten sich wiederum ähnlich und bilden Triebe aus durchschnittlich etwa 75 % der Stängelblätter. Bei Anzucht unter Kurztagbedingungen bildete *las-4*/Columbia durchschnittlich aus 87% der Stängelblätter Triebe (Abb.3.15.B), *las-4*/Ler dagegen nur aus etwa 60 % der Blattachseln. Das Ergebnis der Auswertung der *las-4*-Pflanzen aus der F₂-Generation der Kreuzung *ag-1* und *las-4* liegt also zwischen den beiden anderen Werten. Außerdem ist von Bedeutung, dass trotz Schwankungen keine der 51 analysierten Pflanzen einen so starken Phänotyp wie eine der bereits beschriebenen *eol*-Pflanzen aufweist.

Für die Auswertung der Kartierungspopulation ist das von großer Wichtigkeit, da die Gefahr einen *enhancer* mit einem Hintergrund-Effekt zu verwechseln, laut diesem Experiment gering ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich im *Ler* Hintergrund mehrere Loci befinden, die jeweils den *las-4*-Phänotyp leicht verstärken. Bei mehrfacher Rückkreuzung mit *Ler* akkumulieren diese Loci dann im Hintergrund von *las-4* und verstärken den

Verzweigungsphänotyp. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass sich im *Ler*-Hintergrund *quantitative trait loci* (QTL) finden, die das Verzweigungsmuster von *las-4* beeinflussen.

3.2.8 Kartierung von *eol3*

In den folgenden Abschnitten wird die Kartierung der *eol3*-Mutation beschrieben. Da die Mutation durch EMS erzeugt wurde, muss die Position der Mutation in einem kartierungsgestütztem Ansatz ermittelt werden. Als Kandidat für die Kartierung wurde *eol3* gewählt, da *las-4/eol3*-Pflanzen einen starken Verzweigungs-Phänotyp zeigen, der auch gut von den in den vorangegangenen Abschnitten besprochenen Hintergrundeffekten zu unterscheiden ist.

3.2.8.1 Kartierungskreuzung

Wie beschrieben ist die EMS-Mutagenese mit den Samen, die von einer homozygoten *las-4*-Pflanze abstammten, durchgeführt worden. Da sich die Mutagenese in einem Col-Hintergrund durchgeführt wurde, mussten *eol3/las-4*-Pflanzen mit einem genetischen Hintergrund gekreuzt werden der genügend molekulare Polymorphismen gegenüber Col aufwies, um eine Kartierung zu ermöglichen. Dazu wurden *Ler*-Pflanzen verwendet. Eine Pflanze mit *eol3/las-4*-Phänotyp wurde mit einer *Ler*-Pflanze gekreuzt. Die F₁-Pflanzen wurden im Langtag angezogen und geselbstet. Die Auswertung der Kartierungspopulation ist in Abschnitt 3.2.8.2. beschrieben.

3.2.8.2 Auswertung der Kartierungspopulation

Zur Analyse der F₂-Generation der Kartierungskreuzung (Abschnitt 3.2.8.1.) wurden 2496 Samen ausgelegt und die Pflanzen unter Kurztagbedingungen angezogen. Tabelle 3.12. zeigt die Segregationsanalyse der F₂-Generation. Da wie zuvor beschrieben *eol3* keinen offensichtlichen eigenen Phänotyp hat, wurden zunächst einmal nur Wildtyp und *las-4* Pflanzen voneinander unterschieden, dabei wurden die Stängelblätter nicht beachtet und nur der Seitentriebphänotyp aus der Rosette berücksichtigt. Tabelle 3.13. zeigt, welche Verzweigungsmuster aus Stängelblättern in der Gruppe der *las-4*-Pflanzen dokumentiert wurden. Da in der F₂-Generation zwei Loci segregieren, ist eine 9 : 3 : 3 : 1 Segregation

erwartet. Die Anzahl von 1348 Wt-Pflanzen entspricht in etwa dem Verhältnis von 9/16 (Erwartet: 1365). Dagegen wäre der erwartete Anteil *las-4*-Pflanzen etwa 455 und nicht wie gefunden 906. Die beobachtete Segregation deutet eher darauf hin, dass sich in dieser Gruppe auch homozygote *eol3*-Pflanzen befinden, die nicht homozygot für die *las-4*-Mutation sind dann wäre eine 9 : 7 Segregation erwartet. In diesem Fall wären etwa 1060 Pflanzen mit dem Phänotyp erwartet, was der Zahl von 906 näher kommt. Da die Pflanzen nicht alle molekular auf *las-4* getestet wurden, muss dies in weiteren Studien untersucht werden. Dieses Ergebnis beeinflusst das weitere Vorgehen nicht, da für die Kartierung nur Pflanzen berücksichtigt wurden, die einen starken *eol3/las-4*-Phänotyp hatten. In diesen Pflanzen wurde molekular die Anwesenheit des *las-4*-Allels bestätigt.

Keimungsrate	Wt	<i>las-4</i> (auch enhancer)	Nicht ausgewertet.
97% (2427/2496)	1348	906	167

Tabelle 3.12. Auswertung der F₂-Generation der Kartierungskreuzung zwischen *eol3/las-4* und Ler. Weitere Erläuterung im Text.

Tabelle 3.13. zeigt die phänotypische Analyse der Pflanzen, die einen *las-4*-Verzweigungsphänotyp in der Rosette zeigten. Nur 281 Pflanzen legten Seitentriebe in allen Blattachsen von Stängelblättern an. Des weiteren ist keine klare Aufspaltung von *eol3*-Phänotypen zu erkennen, da auch weniger starke Ausprägung einer unterdrückten Seitentriebbildung festgestellt wurde. Diese ähnelt den für *eol5/las-4* beobachteten Effekten (Abschn.3.2.4.3.) und ist möglicherweise auch durch dosisabhängige Effekte zu erklären.

Deshalb wurden für die weitere Analyse bzw. die Kartierung nur Pflanzen aus den Gruppen 0-20 % ausgewählt. Mit etwa 160 Pflanzen entsprechen sie etwa 1/16 der gesamt F₂-Generation. Es wurde DNS aus Blättern dieser Pflanzen isoliert und für das Kartierungsprojekt verwendet.

%	100	91-99	81-90	71-80	61-70	51-60	41-50	31-40	21-30	11-20	0-10
<i>las-4</i>	281	30	58	95	47	48	59	39	48	54	107

Tabelle 3.13. Phänotypische Analyse der *las-4*-Pflanzen. Auswertung der Menge an Seitentrieben, die aus Stängelblättern gebildet werden. Weitere Erläuterung im Text.

3.2.8.3 PCR-Marker

Die eigentliche Kartierung wurde mit Markern durchgeführt, die auf der PCR-Technologie basieren. Es handelt sich um einen Satz von 22 *simple-sequence-length-polymorphisms* (SSLP)-Markern, die das Genom von *Arabidopsis thaliana* abdecken (Lukowitz et al., 2000). Abbildung 3.25 zeigt eine genetische Karte von *Arabidopsis thaliana*, auf der die 5 Chromosomen gezeigt sind. Die Marker sind jeweils entsprechend ihrer genetischen Position (in cM) auf den Chromosomen angegeben.

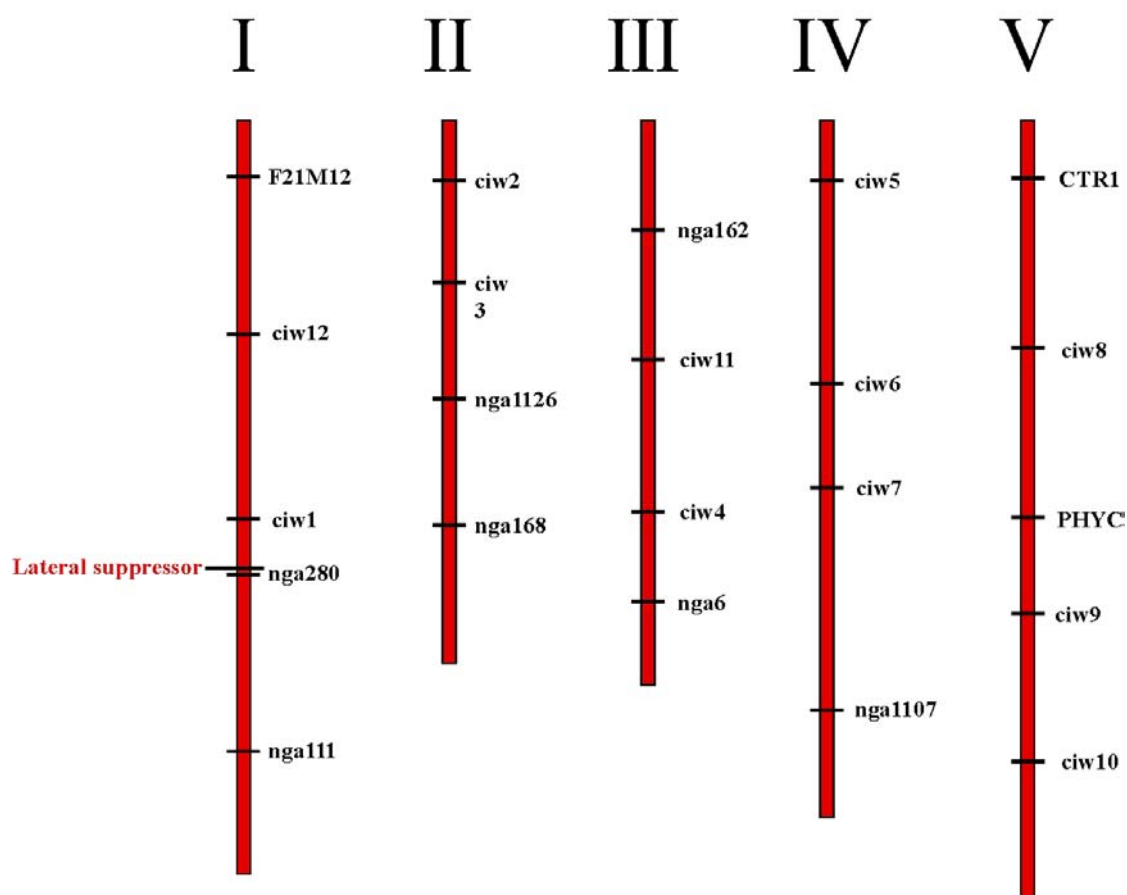


Abb.3.25. Genetische Karte der 5 Chromosomen von *Arabidopsis thaliana*. Eingetragen sind 22 SSLP-Marker gemäß ihrer genetischen Position in cM. Außerdem ist auf Chromosom 1 der *LATERAL SUPPRESSOR* Locus eingezeichnet. Weitere Erläuterung im Text.

Der Vorteil dieser Marker beruht darin, dass der Arbeitsaufwand sehr gering ist. Es wird eine PCR auf der DNA der *eol6/las-4*-Pflanzen durchgeführt und anschließend die Produkte auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Der Polymorphismus besteht in Längenunterschieden der amplifizierten Zielsequenz in den Genomen von Col und Ler. Ähnlich funktionieren auch *cleaved-amplified-polymorphic-sequences* (CAPS)-Marker. Der Polymorphismus besteht in

unterschiedlichen Anzahl Erkennungsstellen von Restriktionsenzymen zwischen *Ler* und *Col*. Auf einem Agarose-Gel kann die unterschiedliche Zahl und Größe der Fragmente sichtbar gemacht werden.

Vier der verwendeten Marker boten kein auswertbares Ergebnis und wurden deshalb ersetzt. Dazu wurden in der *Arabidopsis* Datenbank TAIR entsprechend der genetischen oder physikalischen Position neue PCR-Marker ausgewählt. Auf Chromosom 2 wurde Marker *ciw2* durch den CAPS-Marker T6P5-4.8 ersetzt, außerdem Marker *nga168* durch CAPS-Marker M323. Auf Chromosom 4 wurde statt *ciw6* der CAPS-Marker FCA11 genutzt. Schließlich wurde noch der auf Chromosom 5 liegende Marker *ciw10* durch den SSLP-Marker MBK-5 ausgetauscht.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Besonderheiten bei der Identifizierung von *eol*-Phänotypen wurde auf die von Lukowitz et al. (2000) vorgeschlagene *Pooling*-Strategie der DNS-Isolate der *las-4/eol3*-Pflanzen verzichtet. Dies sollte es ermöglichen solche Pflanzen zu erkennen, die nicht homozygot für *eol3* sind, aber wegen eines Hintergrundeffektes einen enhancer-Phänotyp zeigen.

3.2.8.4 Ergebnisse der Kartierung

Wie bereits beschrieben, wurden PCR Marker für die Untersuchung gewählt, die das Genom von *Arabidopsis* abdecken. Das Prinzip dieser Kartierung ist folgendes: Die Mutation von *eol3* wurde in einem Columbia Hintergrund erzeugt. In einer Kreuzung mit *Ler* findet eine Durchmischung des genetischen Materials der beiden Ökotypen statt. Diese können mit den codominanten PCR-Markern sichtbar gemacht werden. Im Normalfall beobachtet man an jedem Locus eine 1 : 2 : 1 Aufspaltung der *Ler*- und Columbia-Allele. Für die Kartierung wurden nur Pflanzen ausgewählt, die homozygot für das mutante *eol3*-Allel sind. Deshalb muss der Anteil an Columbia DNS bei Markern größer sein, die näher an der Mutation liegen. Zu beachten ist außerdem, dass die Pflanzen mit *eol3*-Phänotyp ebenfalls homozygot für *las-4* sind. An diesem Locus ist ebenfalls ein Anteil Columbia-DNS von 100% zu erwarten.

Tabelle 3.14 und Tabelle 3.15 zeigen das Ergebnis der Kartierung. Nachdem die ausgewählten *eol3/las-4*-Pflanzen mit jedem der Marker getestet war ergab sich folgendes Bild: Auf Chromosom 3 und Chromosom 4 zeigten die Marker eine annähernde 1 : 2 : 1 Segregation (Tabelle 3.14.). Da keiner der Marker klare Abweichungen zeigt, ist der *EOL3*-Locus auf den Chromosomen 3 und 4 nicht zu vermuten.

	Chr. 2				Chr.3				Chr.4				Chr.5				
Marker	T6P5-4.8	Ciw3	Nga1126	M323	Nga162	Ciw11	Ciw4	Nga6	Ciw5	Ciw6	Ciw7	Nga1107	CTR1	Ciw8	PHYC	Ciw9	MBK-5
Analys. Pflanzen	84	82	83	53	84	80	82	75	74	83	69	82	83	82	82	83	82
Gel Col	34	35	32	20	21	22	15	14	13	18	8	15	16	10	11	7	6
Gel Ler	13	9	9	9	21	23	18	22	26	18	15	20	29	31	39	46	45
Gel heterozygot	37	38	42	24	42	35	49	39	35	47	46	47	38	41	32	30	31
Chrom. Col	10 5	108	106	64	84	79	79	67	61	83	62	77	70	61	55	45	44
Chrom. Ler	63	56	60	42	84	81	85	83	87	83	76	87	96 3	10	109	121	120
% Col	62, 5	65, 9	63, 9	60, 4	50	49, 4	48, 2	44, 7	41,2	50	44, 9	47	42, 2	37, 2	33, 5	27, 1	26, 8
% Ler	37, 5	34, 1	36, 1	39, 6	50	50, 6	51, 8	55, 3	58.8	50	55, 1	53	57, 8	62, 8	66, 5	72, 9	73, 1

Tabelle3.14. Molekulare Auswertung der *col3* Kartierungspopulation durch CAPS- und SSLP-Marker. Analysierte Pflanzen

Auf Chromosom 2 findet sich zwar eine Abweichung von 1 : 2 : 1 Segregation, allerdings bei den 4 Markern in gleichem Umfang. Jeder der vier Marker konnte zwischen 60 und 65% Anteil an Col-DNS nachweisen. Dies ist im Zusammenhang zu sehen mit den Kontrollexperimente mit der *las-4*-Mutation im Col- und im Ler-Hintergrund (Abb. 3.15.; Abb. 3.23.; Abb. 3.24.). Dabei wurde nachgewiesen, dass einer oder mehrere Loci im Col- und Ler-Genom *enhancer*-Effekte auf den *las-4*-Verzweigungs-Phänotyp ausüben. Der auf Chromosom 2 gefundene Effekt deutet darauf hin, das sich auf dem Col Chromosom Verteilt *quantitative trait loci* (QTL) befinden. Eine ähnliche Situation ist auf Chromosom 5 zu beobachten. Im Gegensatz zu Chromosom 2 ist hier bei den Markern ein Anteil an Ler-DNS von 57 bis 67 % festzustellen. Dies könnte auf einen QTL im Ler-Genom hinweisen. Diese Ergebnisse könnten bei der Identifizierung neuer Loci, die die Anlage von Achselmeristemen regulieren hilfreich sein. Wie durch die Kontrollexperimente bestätigt behindern sie die Kartierung des *EOL3*-Locus nicht.

	Chromosom 1												
	F21M12	M235	NF21J19	ZFBP	CIW12	Nga392	SO392	7G6	Mi342	Ciw1	LAS	Nga280	Nga111
Pflanzen	84	84	80	84	84	84	83	83	84	84	84	84	82
Homozygot Col	45	74	79	83	84	84	82	80	81	80	84	84	51
Homozygot Ler	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Heterozygot	34	9	1	1	0	0	1	3	3	4	0	0	26
Col Chromosomen	124	157	159	167	168	168	165	163	165	164	168	168	128
Ler Chromosomen	44	11	1	1	0	0	1	3	3	4	0	0	36
% Columbia	73,8	93,5	99,4	99,4	100	100	99,4	98,2	98,2	97,6	100	100	78
% Landsberg	26,2	6,5	0,6	0,6	0	0	0,6	1,8	1,8	2,4	0	0	22

Tabelle 3.15.: Molekulare Auswertung der *eol3* Kartierungspopulation durch CAPS- und SSLP-Marker. Analysierte Pflanzen

Das Ergebnis der Analyse der Marker von Chromosom 1 ist in Tabelle 3.15. dargestellt. Zu beachten ist, dass sich der *LAS*-Locus auf Chromosom 1 befindet. Bereits vor der Kartierung waren alle ausgewählten *eol3/las-4*-Pflanzen mit dem CAPS-Marker mTest_*las-4* getestet und die Homozygotie für *las-4* bestätigt worden. Die Tatsache, dass der flankierende Marker Nga280 100 % Col-DNS nachweist ist auf die physikalische Nähe zu *las-4* zurückzuführen. Interessanterweise zeigte der etwa 40 cM von *LAS* entfernt kartierende Marker ciw12 ebenfalls Cosegregation. Molekulare Marker, die zwischen den Loci kartieren zeigen 0,6 % (SO392) bis 2,4 % (ciw1) Ler-DNS. Dieser Effekt, der vermutlich auf doppelte Rekombination zurückzuführen ist, bestätigt, dass es sich um 2 unterschiedliche Loci handelt, *LAS* und *EOL3*. Zusätzlich bestätigt wird das durch die Analyse des Markers ciw12 in einer Kontrollpopulation. Dabei handelt es sich um *las-4*-Pflanzen, die in der F₂-Population der Kreuzung zwischen *las-4* und *ag-1* ausgewählt wurden. Da die *ag-1*-Mutation in einem Ler-Hintergrund ist, ist hier eine ähnlich Situation wie in der F₂-Generation der Kartierungspopulation ohne die *eol3*-Mutation vorhanden.

Tabelle 3.16. zeigt die Auswertung der Kartierung und zeigt, dass ohne *eol3* im Hintergrund der Marker etwa 31 % Ler-DNS nachweist. Da *LAS* etwa 40 cM vom Marker ciw 12 kartiert bestätigt dieses Ergebnis, das in der Kartierungspopulation tatsächlich *eol3* mit diesem Marker cosegregiert.

	Col	heterozygot	Ler	% Col	% Ler
<i>las-4</i>	13	7	4	69%	31 %

Tabelle 3.16. Auswertung Marker ciw12 auf *las-4*-Pflanzen, die in der F₂-Generation der Kreuzung *ag-1/las-4* ausgewählt wurden.

Nachdem mehr flankierende Marker in die Analyse mit einbezogen wurden konnte ein Bereich von 2,1 Mb ausgemacht werden, in dem das *EOL3*-Gen lokalisiert sein muss. So wurden zwei Marker (ciw12 und nga392) gefunden, die mit *eol3* Cosegregieren. Sie liegen bei 9,6 bzw. 9,8 Mb (AGI Karte) auf Chromosom 1. Daneben wurden auf beiden Seiten in einer Distanz von etwa 1 Mb die Marker ZFBP und SO392 gefunden, die jeweils eine Rekombination nachweisen konnten. Dies ist in Abbildung 3.26 dargestellt. Der vorgefundene Bereich von etwa 2,1 Mb umfasst mehrere Hundert Gene.

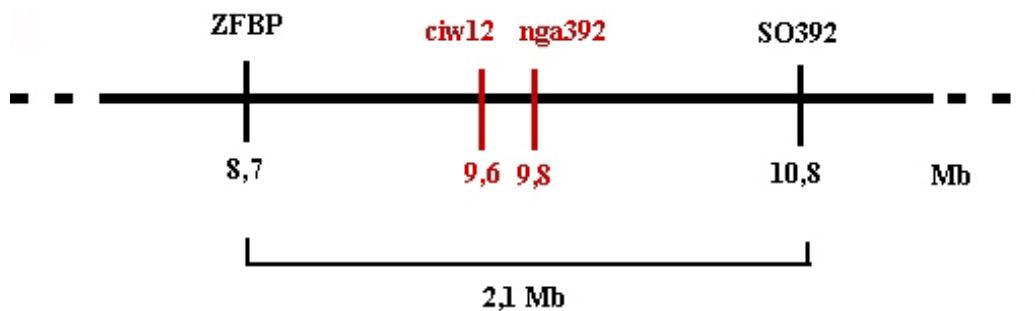


Abb.3.26. Feinkartierung von *EOL3* auf Chromosom 1. Weitere Informationen im Text

Somit ist festzustellen, dass sich das *EOL3*-Gen auf Chromosom 1 in Kopplung mit dem *LAS*-Locus befindet. Weitere Analysen sind für eine Fein-Kartierung und Klonierung des Gens notwendig. Außerdem konnten in der Untersuchung weitere Loci im Col und Ler Genom erkannt werden, die ebenfalls zu einer Verstärkung des *las-4*-Verzweigungsphänotyps führen.

4 Diskussion

4.1 Analyse der Doppelmutanten

4.1.1 *LAS* und *REV* wirken im gleichen Entwicklungsweg

In *Arabidopsis* sind verschiedene Mutationen bekannt, die zu einer Unterdrückung der Seitentriebebildung führen. Dazu gehören unter anderem *LAS* und *REV*. Um zu überprüfen, ob *LAS* und *REV* im selben Stoffwechselweg fungieren, wurden Doppelmutanten der starken Allele *las-4* und *rev-5* hergestellt (Greb et al., 2003; Talbert et al., 1995). Die Analyse der F₂-Generation legt den Schluss nahe, dass die Doppelmutante phänotypisch einer der beiden Ausgangsmutanten gleicht, da bei 100 % Keimungsrate nur Wildtyp-Pflanzen, *las-4*- und *rev-5*-Phänotypen gefunden wurden. In zwei segregierenden F₃-Populationen konnte gezeigt werden, dass *rev-5/las-4*-Doppelmutanten phänotypisch tatsächlich *rev-5*-Einzelmutanten gleichen.

Dieses Ergebnis gibt Anlass zu der Vermutung, dass *LAS* und *REV* nicht im selben Entwicklungsweg wirken. Da die Doppelmutanten nie einen stärkeren Verzweigungsphänotyp als den von *rev-5*-Mutanten zeigten, ist es unwahrscheinlich, dass beide Gene in redundanten Stoffwechselwegen zur Initiation von Lateralmeristemen fungieren. Da in *rev-5* die Anlage aller Achselmeristeme bereits unterdrückt ist (Talbert et al., 1995), kann dieser Effekt auf die Bildung der Lateralmeristeme nicht verstärkt werden. Da einerseits *las-4* die Variabilität des *rev-5*-Phänotyps unterdrückt und *rev-5* den *las-4*-Phänotyp in der Rosette verstärkt liegt die Vermutung nahe, dass beide Gene in unterschiedlichen Entwicklungswegen liegen. Außerdem konnte bei der Charakterisierung von *las-4/stm-2*- und *las-4/wus-1*-Doppelmutanten gezeigt werden, dass *las-4* einen anderen Effekt auf *stm-2* und *wus-1* hat als *rev-6* (Otsuga et al., 2001).

Die durchgeführte Analyse lässt keine Schlüsse über die Hierarchiebeziehung beider Gene zueinander zu. Da beide Mutationen in der Rosette zu einer Unterdrückung der Seitentriebebildung führen, kann nicht unterschieden werden, welche Funktion zur Anlage von Lateralmeristemen zuerst benötigt wird. Allerdings konnten Greb et al. bereits zeigen, dass *LAS* in Blattachsen von *revoluta*-Mutanten exprimiert wird, *REV* aber nicht in Blattachsen von *las-4*-Mutanten (Greb et al., 2003). Das weist darauf hin, dass die Funktion von *LAS*

zeitlich vor der von *REV* liegt. *LAS* wird an der adaxialen Blattbasis exprimiert und ist möglicherweise daran beteiligt, das meristematische Potenzial der Zellen noch vor der Etablierung eines funktionierenden Meristems zu erhalten. *REV* wird hingegen in provasculärem Gewebe exprimiert. Um eine solche Struktur anzulegen muss ein Meristem bereits etabliert sein (Otsuga et al., 2001; Zhong and Ye, 2001).

4.1.2 Bei der Bildung von Seitentrieben aus der Rosette wird die Funktion von *LAS* früher benötigt als die von Genen, die das Auswachsen der Knospen regulieren

4.1.2.1 *las-4* wirkt epistatisch über *max1-1* und *max2-1* bei der Anlage von Seitentrieben aus der Rosette

Die *las-4*-Mutation wurde mit verschiedenen Mutationen kombiniert, die zu einem verstärkten Auswachsen von Seitentrieben aus der Rosette führen. Da diese Mutanten in der vegetativen Phase einen entgegengesetzten Phänotyp zum *las-4*-Phänotyp zeigen (Stirnberg et al., 2002; Greb et al., 2003), konnte durch Analyse der jeweiligen Doppelmutanten die Hierarchiebeziehung der Gene zueinander geklärt werden. In *las-4/max1-1*-Doppelmutante ist die Seitentriebbildung aus Achseln von Rosettenblättern unterdrückt. Somit wirkt *las-4* in Bezug auf die Anlage von Achseltrieben aus der Rosette epistatisch über *max1-1*. Das selbe Ergebnis wurde für *las-4/max2-1* erhalten. Dass beide Doppelmutanten jeweils in Sprosslänge und Blattform den *max1-1*- bzw. *max2-1*-Mutanten gleichen, könnte dadurch erklärt werden, dass *LAS* nur in einer schmalen Domäne an der adaxialen Blattbasis exprimiert wird. Dies korreliert auch mit der phänotypischen Charakterisierung von *las-4*, die keinerlei Hinweise lieferte, dass *LAS* einen Einfluss auf die Blattentwicklung ausübt (Greb et al., 2003).

Das *MAX2*-Gen kodiert ein F-Box Protein, dass bereits als möglicher Regulator von Blattseneszenz, ORE9, beschrieben wurde (Woo et al., 2001; Stirnberg et al., 2002). Studien haben gezeigt, dass F-Box Proteine als Untereinheit von E3-Ubiquitin-Ligasen des SCF-Typs fungieren und einen Teilschritt der Ubiquitinierung von Proteinen katalysieren. Diese posttranslationale Modifikation markiert Proteine für den Abbau durch Proteolyse (Samach et al., 1999; Xu et al., 2003). Dies legt den Schluss nahe, dass der Phänotyp von *max2-1*

möglicherweise durch eine veränderte Verteilung mehrerer Zielproteine der durch MAX2 vermittelten Ubiquitinierung ausgelöst wird.

Das *MAX1*-Gen ist bisher nicht kloniert: Doppelmutantenanalysen konnten aber zeigen, dass MAX1 und MAX2 in einem gemeinsamen Stoffwechselweg fungieren (Stirnberg et al., 2002).

Diese Studie bestätigt die Annahme, dass *LAS* einen frühen Schritt bei der Anlage von Achseltrieben reguliert. Aufgrund des Phänotyps, sowie der zeitlichen und räumlichen Expression von *LAS* wird angenommen, dass es das Schicksal meristematischer Zellen in Blattachsen beeinflusst. Somit hat es eine Funktion bei der Initiation der Achselmeristeme. Die Funktion von MAX1 und MAX2, die darin besteht, das Auswachsen von Achselknospen zu unterdrücken, ist später in der Entwicklung einzuordnen, da funktionierende Meristeme angelegt sein müssen.

4.1.2.2 *las-4* wirkt epistatisch über *axr1-12* bei der Anlage von Achseltrieben in älteren Rosettenblättern

In einem weiteren Experiment wurden *axr1-12/las-4*-Doppelmutanten charakterisiert. Wie *axr1-12*-Einzelmутanten zeigten diese eine reduzierte Länge des Hauptsprosses und gesägte Ränder der Rosettenblätter (Lincoln et al., 1990; Greb et al., 2003). Ähnlich zu *max1-1/las-4* und *max2-1/las-4* war die Anlage von Seitensprossen in den Achseln der meisten Rosettenblätter unterdrückt. Bei der Dekapitierungsanalyse von *axr1-12/las-4*-Pflanzen wurde aber ein Unterschied zu den *max/las-4*-Doppelmutanten deutlich. Während *max-1/las-4* und *max2-1/las-4* tendenziell weniger Triebe aus der Rosette produzierten als *las-4* Einzelmутanten, ist der für *axr1-12/las-4* ermittelte Wert etwas höher. Die Ursache für die größere Zahl an Seitentrieben in *axr1-12/las-4* liegt darin, dass mehr der obersten Rosettenblätter Triebe bilden. Hier müssen also zwei Effekte unterschieden werden. Zum einen wirkt *las-4* in den Achseln der älteren Rosettenblättern epistatisch über *axr1-12*. Da AXR1 das Auswachsen von Achselknospen unterdrückt (Stirnberg et al., 1999), bestätigt dieses Resultat eine frühe Funktion von LAS bei der Initiation von Lateralmeristemen.

Zum anderen ist die Seitentriebbildung in *axr1-12/las-4* im Vergleich zu *las-4* schon in älteren Rosettenblättern unterdrückt. Die Domäne, in der die LAS-Funktion zur Anlage von Lateralmeristemen gebraucht wird, umfasst in *axr1-12*-Mutanten weniger Blattachsen als im Wildtyp. Es ist unwahrscheinlich, dass der Zwergwuchs von *axr1-12* den entscheidenden

Einfluss ausübt, da auch *max-1-1* und *max2-1* reduzierte Sprosslänge aufweisen. In diesen Doppelmutanten ist sogar ein tendenziell gegenteiliger Effekt dokumentiert worden. *AXR1* kodiert eine Untereinheit eines heterodimeren RUB-aktivierenden Enzyms (del Pozo et al., 1998). Die Modifikation von Proteinen durch das *ubiquitin-related-protein* (RUB, findet durch einen der Ubiquitinierung verwandten Mechanismus statt. Vermutlich wird durch Konjugation von RUB die zelluläre Lokalisation von Proteinen bestimmt (Lammer et al., 1998; Morimoto et al., 2000). Der pleiotrope Phänotyp von *axr1-12* bekräftigt die Vermutung, dass AXR1 mehrere Proteine als Substrat haben (Lincoln et al., 1990). In *axr1-12*-Mutanten könnten also einerseits Zielproteine betroffen sein, die das Auswachsen von Achselknospen unterdrücken. Andererseits Zielproteine, die beeinflussen in welcher Domäne LAS bei der Initiation von Achselmeristemen benötigt wird. *AXR1* beeinflusst eindeutig die Signaltransduktion des Phytohormons Auxin und *axr1-12*-Mutanten insensitiv gegenüber Auxin. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Auxin möglicherweise eine Funktion bei der Anlage und beim Auswachsen von Achseltrieben ausübt.

4.1.2.3 *axr1-12* Mutanten benötigen *LAS* bei der Anlage akzessorischer Triebe

Bei der genaueren Analyse der *axr1-12*- und *axr1-12/las-4*-Pflanzen konnte ein weiterer phänotypischer Unterschied festgestellt werden. Während *axr1-12*-Pflanzen akzessorische Triebe aus den Achseln der meisten Stängelblätter bildeten, konnte dies bei Doppelmutanten nur selten beobachtet werden (Greb et al., 2003). Akzessorische Triebe entstehen im Wildtyp und in *axr1-12* mit zeitlicher Verzögerung zum primären Seitentrieb. Sie werden zwischen der abaxialen Basis des primären Seitentriebs und der adaxialen Blattbasis des Stängelblattes angelegt.

Daraus kann geschlossen werden, dass *LAS* eine zusätzliche Funktion bei der Anlage der Seitentriebe in den Achseln von Stängelblättern hat. Dass *LAS* in vegetativen-, Infloreszenz- und floralen Meristemen exprimiert wird, konnte bereits in vorherigen Studien gezeigt werden (Greb et al., 2003).

Um die Frage zu beantworten, warum die Seitentriebbildung in *las-4*-Mutanten nur in der Blattrosette unterdrückt ist, und nicht –obwohl *LAS* im Wildtyp dort auch exprimiert wird- in Achseln von Stängelblättern, gibt es zwei Erklärungsansätze: Einerseits könnte während der Blühinduktion ein zu *LAS* redundantes Protein aktiviert werden, das *LAS*-Funktion in

Stängelblättern von *las-4*-Mutanten ersetzen kann. Dazu ist anzumerken, dass im *Arabidopsis* Genom kein weiteres Gen vorhanden ist, das außerhalb der in der GRAS-Gen-Familie konservierten Domäne eine auffallende Homologie zu *LAS* aufweist (Rossberg et al., 2001). Möglicherweise wird die Funktion aber durch ein nicht homologes Gen ersetzt.

Andererseits ist es auch möglich, dass *LAS* nur in solchen Meristemen benötigt wird, die vor dem Auswachsen eine Ruhephase durchlaufen. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass andere Gene der GRAS-Familie die Zelldifferenzierung regulieren. So sind *SHORTROOT* (*SHR*) und *SCARECROW* (*SCR*) an der radiären Musterbildung der Wurzel beteiligt (Di Laurenzio et al., 1996; Nakajima et al., 2001) und das *HAIRY MERISTEM*-Gen (*HAM*) (Stuurman et al., 2002) aus Petunie schützt das apikale Sprossmeristem vor Differenzierung in terminale Strukturen. Außerdem wirken *REPRESSOR OF GAI-3* (*RGA*) und *GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE* (*GAI*) indirekt durch ihre Beteiligung an der Signaltransduktion des Phytohormons GA auch auf Zelldifferenzierung ein (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998). Ähnlich wie bei *HAM* könnte die Funktion von *LAS* demnach sein, das meristematische Potenzial der Zellgruppen an der adaxialen Blattbasis zu erhalten und sie davor zu schützen, einen weiteren Differenzierungsschritt zu durchlaufen.

Da im vegetativen Apex eine hohe Apikaldominanz vorliegt, bilden sich die Achselmeristeme erst nach der Blühinduktion aus. Zum Zeitpunkt der Blühinduktion sind die Rosettenblätter die ältesten Blätter und am weitesten vom Infloreszenzmeristem entfernt. Dagegen befinden sich die jüngeren Stängelblätter noch im Einflussbereichs der *STM*-Expression des SAM und benötigen keine *LAS*-Funktion.

Letztere Theorie wird durch die Unterdrückung der Anlage akzessorischer Triebe in *axr1-2/las-4*-Doppelmutanten bekräftigt. Obwohl primärer und akzessorischer Trieb aus der selben Blattachsel entstehen, wird *LAS* für die Anlage des primären Triebs nicht benötigt, der akzessorische Trieb dagegen kann ohne *LAS* nicht angelegt werden. Der Unterschied zwischen beiden Trieben ist, dass der primäre direkt auswächst und der akzessorische mit zeitlicher Verzögerung und in einer räumlichen Distanz zum Sprossmeristem. Eine mögliche Erklärung wäre also, dass *LAS* dafür nötig ist, das meristematische Potenzial der Zellen an der Blattbasis zu erhalten. Ohne *LAS*-Funktion differenzieren diese Zellen und können kein Meristem mehr bilden. Dies wäre eine ähnliche Funktion wie *HAM* im SAM von Petunie ausübt.

4.1.3 Die postembryonale Organogenese ist in *stm-2/las-4*- und *wus-1/las-4*-Doppelmutanten nicht unterdrückt

Bei der Charakterisierung von *stm-2/las-4*-Doppelmutanten konnte gezeigt werden, dass *las-4* die frühe postembryonale Organogenese in *stm-2* Mutanten nicht unterdrückt. So unterliefen Doppelmutanten in gleicher Weise ein „Stop-and-go“ Wachstum wie *stm-2* Mutanten. In dieser Hinsicht verhält sich *las-4* anders zu *stm-2* als *rev-6*. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass *rev-6* die postembryonale Organogenese in *stm-2* teilweise unterdrückt (Otsuga et al., 2001). Die neu gebildeten Meristeme in *stm-2* haben folglich den Charakter von Achselmeristemen. Dieses Ergebnis bestätigt, dass *REV* und *LAS* eine unterschiedliche Rolle bei der Anlage von Achselmeristemen spielen. Diese Beobachtung lässt sich mit dem in Abschnitt 4.1.2. aufgestellten zweiten Modell der Funktion von *LAS* erklären. Demnach ist *LAS* nur dann nötig, wenn ein Meristem eine Ruhephase durchläuft. Dies geschieht nicht während der frühen postembryonalen Entwicklung von *stm-2*. Nachdem ein Meristem aufgehört hat laterale Organe zu produzieren vergeht zwar eine kurze Zeit, bis sich neue Meristeme in den Achseln der Blätter gebildet haben, diese wachsen dann aber sofort aus. *rev-6* dagegen unterdrückt die Bildung aller Lateralmeristeme und hat deshalb einen stärkeren Effekt. Während der späteren Entwicklung allerdings beeinflusst *las-4* das Verzweigungsmuster von *stm-2*. Die Doppelmutanten sind weniger verzweigt als *stm-2* Pflanzen. Möglicherweise ist die zeitliche Abstimmung zwischen Initiation und Auswachsen der Achselmeristeme in der späten postembryonalen Entwicklung anders als während der frühen.

Außerdem war die Architektur der Infloreszenz in *stm-2/las-4* anders als in *stm-2*. In den Doppelmutanten bildeten sich oft terminale Blüten, die aber in der Mitte des floralen Meristems wieder ein Internodium und neue Wirtel von Sepalen produzierten. Dagegen bildet *stm-2*-Infloreszenzen, die aus mehreren Blüten bestehen, allerdings verlängern sich die Internodien nicht. Hier haben *LAS* und *STM* offenbar eine überlappende Funktion, die erst in der Doppelmutante sichtbar wird. Der Blütenphänotyp könnte darauf beruhen, dass beide Gene die Differenzierung von Zellen regulieren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass *LAS* auch eine Funktion in Blüten hat.

Einen weiteren Hinweis auf die Funktion von *LAS* liefern die in *stm-2/las-4* gefundenen starken Fusionen der Blattstiele. *LAS* wird im Wildtyp in einer Domäne entlang der adaxialen Blattbasis exprimiert. Die Funktion von *LAS* könnte also darin bestehen, dort eine Gruppe meristematischer Zellen zu erhalten und sie davor zu schützen, sich weiter zu differenzieren.

Diese Zellgruppe kann dann als eine Grenzschicht zwischen Blattprimordien fungieren, die beim Auswachsen benachbarter Primordien deren Fusionierung verhindert. Dass dieser Phänotyp nur in *stm-2/las-4* zu sehen ist und nicht in *las-4* kann daran liegen, dass die Anlage der Organe im *stm-2*-Hintergrund viel ungeordneter abläuft. Es kann aber auch in diesem Fall auf eine überlappende Funktion von LAS und STM hindeuten.

Da in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, dass *rev-6* auch die postembryonale Entwicklung von *wus-1*-Mutanten unterdrücken kann (Otsuga et al., 2001), wurde dieser Aspekt bei *wus-1/las-4*-Pflanzen untersucht. Auch hier wurde keine Unterdrückung der Bildung neuer Meristeme festgestellt. Die vorher festgestellten Unterschiede zwischen *REV* und *LAS* bestätigen sich auch in diesem Experiment. Wie im vorigen Abschnitt besprochen, wird in *wus-1*-Mutanten LAS möglicherweise nicht gebraucht, da die neu gebildeten Meristeme vor dem Auswachsen keine Ruhephase durchlaufen.

Allerdings unterdrückte *las-4* die Bildung von „Luftrosetten“ in *wus-1*-Mutanten. Zu diesem späteren Zeitpunkt der Entwicklung ist der Ablauf bei Initiation und Auswachsen von Achselmeristemen möglicherweise anders als in der frühen postembryonalen Entwicklung. Jedenfalls wird LAS für die Bildung von Luftrosetten in *wus-1* offenbar benötigt.

Interessanterweise konnte auch in *wus-1/las-4* Mutanten eine starke Tendenz zur Fusionierung von Blattstielen gezeigt werden. Hier scheint LAS ebenfalls eine Grenzfunktion bei der Entwicklung benachbarter Blattprimordien zu haben. Da dieser Effekt ebenfalls in *wus-1*-Einzelmutanten, wenn auch in deutlich niedriger Frequenz, gefunden wurde, scheinen LAS und WUS hier eine überlappende Funktion zu haben.

4.1.4 *clv3-2/las-4*-Pflanzen zeigen keine synergistischen Effekte

clv3-2/las-4-Doppelmutanten haben wie *clv3-2*-Pflanzen ein stark vergrößertes Meristem. Dies führt zu Fasziation, einer gestörten Phyllotaxis und einer größeren Anzahl Blütenorgane (Clark et al., 1995). Die Anlage von Seitentrieben in Achseln der Rosettenblätter ist wie bei *las-4* unterdrückt.

Im Gegensatz zu *wus-1*-Mutanten haben *clv3-2*-Mutanten eine stark vergrößerte Stammzellpopulation. Bei der Doppelmutantenanalyse konnten keinerlei synergistische Effekte dokumentiert werden. Hinweise, dass LAS und CLV3 eine überlappende Funktion haben oder im selben Signaltransduktionsweg fungieren, wurden nicht gefunden.

4.1.5 Die geänderte Meristem-Identität von *lfy-14*-Mutanten verstärkt den *las-4*-Phänotyp

In diesem Experiment sollte getestet werden, ob die Meristemidentität einen Einfluss auf den Phänotyp von *las-4* hat. Zu diesem Zweck wurden *lfy-14/las-4*-Doppelmutanten von *las-4* und *lfy-14* charakterisiert. Das *LFY*-Gen wird durch Komponenten der Blühinduktionswege aktiviert und fungiert als Meristem-Identitätsgen. In *lfy-14*-Mutanten ist der Übergang vom vegetativen zum Infloreszenzmeristem gestört. Die Blühinduktion findet statt, es wächst ein Hauptspross mit verlängerten Internodien aus, aber das Meristem produziert weiterhin laterale Organe mit vegetativem Charakter (Weigel et al., 1992).

Durch die Kombination der *las-4*- und der *lfy-14*-Mutationen sollte untersucht werden, warum *las-4*-Mutanten in Achseln von Stängelblättern im Gegensatz zu Rosettenblättern Seitensprosse anlegen können.

Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen und ihr Verzweigungsmuster untersucht. Sowohl *lfy-14* als auch *lfy-14/las-4* produzierten einen Spross mit verlängerten Internodien, allerdings legte das Apikalmeristem fortwährend Blätter als laterale Organe an. Während *lfy-14*-Pflanzen in den meisten Achseln Seitentriebe anlegen ist dies bei *lfy-14/las-4* in den Achseln der meisten Stängelblätter unterdrückt. Somit verstärkt *lfy-14* den *las-4*-Phänotyp. Dieses Ergebnis gibt wichtige Hinweise auf den Mechanismus, der das Verzweigungsmuster von *las-4*-Pflanzen zugrunde liegt.

Zunächst kann festgestellt werden, dass nicht die Bildung verlängerter Internodien zwischen Blättern nach der Blühinduktion LAS in *las-4*-Mutanten entbehrlich macht. Dies wäre durchaus mit der aufgestellten Hypothese vereinbar gewesen, da sich bei längeren Internodien das Apikalmeristem und die nächstjüngeren Blätter schneller von den darunter liegenden Blattachseln entfernen und der Einfluss der Apikaldominanz schneller schwächer wird.

Da dieses Element der Blühinduktion in *lfy-14/las-4* stattfindet, die Pflanzen aber trotzdem keine Seitentriebe aus Stängelblättern anlegen, ist ein solcher Einfluss unwahrscheinlich.

Somit hat offenbar die vegetative Meristem-Identität zur Folge, dass die Verzweigung aus Stängelblättern der Doppelmutante unterdrückt ist. Die mögliche Erklärung wäre, dass ein vegetatives Meristem eine hohe Apikaldominanz ausübt, ein Infloreszenzmeristem dagegen nicht (Cline, 1997; Napoli et al., 1999). Während der vegetativen Entwicklung einer *Arabidopsis* Pflanze wird dies dadurch deutlich, dass Rosettenblätter angelegt werden, zunächst aber keine Achselmeristeme auswachsen. Nach der Blühinduktion und der Etablierung des Infloreszenzmeristems verlängern sich die Internodien. Gleichzeitig bilden

sich ohne Ruhephase Seitentriebe aus Achseln von Stängelblättern. Zwar wurde bisher nur ein Einfluß der Apikaldominanz auf das Auswachsen von Lateralmeristemen nachgewiesen, allerdings weist die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der *axr1-12/las-4* Doppelmutante darauf hin, dass Auxin sowohl bei der Anlage als auch beim Auswachsen von Lateralmeristemen einen regulatorischen Einfluss ausübt. Dieses Ergebnis unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass LAS dafür notwendig ist, meristematische Zellgruppen an der adaxialen Blattbasis zu erhalten und davor zu schützen weitere Differenzierungsschritte durchzuführen. Meristeme in Blattachsen, die sich im Einflussbereich der *STM*-Expression des Apikalmeristems befinden, benötigen diese Funktion zur Anlage von Lateralmeristemen nicht.

In einem zusätzlichen Experiment wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen angezogen. Dabei zeigten *lfy-14/las-4*-Pflanzen das selbe Verzweigungsmuster wie *las-4*-Mutanten. Allerdings ist der *lfy-14*-Phänotyp unter diesen Anzuchtbedingungen weniger stark ausgeprägt. So bilden *lfy-14*-Pflanzen laterale Organe, die Blüten ähneln. Eine genauere Charakterisierung zeigt aber, dass diese Strukturen ein Tragblatt aufweisen, außerdem legt das laterale Meristem Organe spiralförmig und nicht in Wirteln an.

Die Meristem-Identität ist in *lfy-14*-Mutanten unter Langtagbedingungen zwar immer noch vegetativ, es sind aber mehr Elemente eines Infloreszenzmeristems zu erkennen. Diese schwächere Ausprägung reicht offensichtlich nicht aus, um den *las-4*-Phänotyp zu verstärken. In diesem Experiment konnte also gezeigt werden, dass die geänderte Meristemidentität einen verstärkenden Einfluss auf das *las-4*-Verzweigungsmuster hat.

4.1.6 Charakterisierung von *ap1-10/las-4*-Doppelmutanten

4.1.6.1 Die Anlage von Achselmeristemen bei Stängelblättern ist in *ap1-10/las-4*-Pflanzen nicht unterdrückt

Da *API* unter anderem ebenfalls als Meristem-Identitätsgen fungiert, wurde auch das Verzweigungsmuster von *ap1-10/las-4*-Pflanzen unter Kurztagbedingungen analysiert. *API* ist im Gegensatz zu *LFY* für einem späteren Entwicklungsschritt essentiell. Es ist für den Übergang vom Infloreszenz- zum floralen Meristem notwendig. In *ap1-10*-Mutanten haben

die floralen Meristeme eine Restaktivität eines Infloreszenzmeristems, was durch die Bildung ektopischer Blüten an Blütenstielen und aus den Achseln der Sepalen sichtbar wird.

Das Experiment zeigte, dass *ap1-10/las-4*-Pflanzen anders als *lfy-14/las-4* das gleiche Verzweigungsmuster wie *las-4* haben. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass nur ein Meristem mit vegetativer Identität Verzweigung im *las-4*-Hintergrund unterdrückt. Wie schon bei der schwachen Ausprägung von *lfy-14* unter Langtagbedingungen erkennbar, reichen weiter in Richtung florale Entwicklung fortgeschrittene Meristeme hierfür nicht aus. In *ap1-10*-Mutanten sind die Meristeme noch weiter in Richtung florales Meristem entwickelt. Sie haben auch unter Kurztagbedingungen keinen Einfluss auf das *las-4* Verzweigungsmuster.

4.1.6.2 *las-4* unterdrückt die Anlage ektopischer Blüten in *ap1-10*-Mutanten.

Es konnte allerdings ein klarer Einfluss von *las-4* auf die Bildung ektopischer Blüten gezeigt werden. *ap1-10/las-4*-Doppelmutanten bildeten in den meisten Fällen lediglich eine Blüte je Blütenstiel. *ap1-10*-Pflanzen bildeten hingegen vor allem von den ersten Blütenstielen durchschnittlich etwa 3 Blüten. Da die meisten ektopischen Blüten in den Achseln von Sepalen angelegt werden, zeigen sie Charakteristika von Seitensprossen. Vorherige Studien konnten zeigen, dass *LAS* in den Achseln von Sepalen exprimiert wird (Greb et al., 2003). Dieses Resultat deutet auf eine Funktion von *LAS* auch in der reproduktiven Wachstumsphase. Wie die Unterdrückung der akzessorischen Triebe in *axr1-12/las-4*-Mutanten kann auch hier ein Prozess nicht ohne *LAS* ablaufen. Das unterstützt die Vermutung, dass *LAS* in der reproduktiven Phase vorhanden und funktionell ist, der entsprechende Mechanismus während dieser Wachstumsphase für die Anlage von Lateralmeristemen in Wildtyp-Pflanzen aber nicht realisiert wird.

Eine Unterdrückung der Bildung ektopischer Blüten in *ap1* konnte ebenfalls in der Doppelmutante *ap1-1/agl24* beobachtet werden (Yu et al., 2004). Der Grund dafür liegt darin, dass *AP1* im Wildtyp als Repressor von *AGL24* fungiert. Dadurch wird *AGL24* in *ap1*-Mutanten stärker exprimiert und somit auslösend für den Phänotyp. Dieser Effekt fällt in der Doppelmutante weg. *agl24* unterdrückt auch den Petalen-Phänotyp von *ap1-1*.

Im Gegensatz dazu beeinflusst *las-4* in keiner Weise die Defekte der Blütenorgan-Identität von *ap1-10*. Die Bildung ektopischer Blüten wird also nicht unterdrückt, weil *las-4* die

Meristem- bzw. die Blütenorgan-Identität in *ap1-10* verändert, sondern weil spezifisch die Anlage lateraler Meristeme an Blütenstielen unterdrückt wird.

4.1.7 *ag-1/las-4*-Doppelmutanten

Die *ag-1*-Mutante wurde ebenfalls in die Analyse mit einbezogen, da sie florale Meristeme produziert, die nicht terminieren. Dies beruht darauf, dass *AG* einerseits als C-Funktion Blütenorgan-Identitätsgen wirkt und andererseits für die Termination des floralen Meristems nötig ist. Der Phänotyp von *ag-1* besteht darin, dass sich Wirtel mit Sepalen und Petalen immer wiederholen (Yanofsky et al., 1990). Da *LAS* an der Basis von Sepalen exprimiert wird und vermutlich einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung ausüben kann, sollte geprüft werden, ob *LAS* in *ag-1* eine Funktion bei der Aufrechterhaltung des Meristems hat.

Zu diesem Zweck wurden die Doppelmutanten analysiert. In *ag-1/las-4*-Pflanzen terminierten die floralen Meristeme nicht und auch sonst zeigte der Blütenphänotyp keine Veränderung gegenüber *ag-1*-Einzelmutanten.

Damit konnte gezeigt werden, dass *LAS* in *ag-1*-Pflanzen keine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung des floralen Meristems spielt.

4.2. *enhancer/suppressor*-screen

4.1.8 *eol1*, *eol3*, *eol5* und *eol6* verstärken den Verzweigungsphänotyp von *las-4* unter Kurztagbedingungen

In einer Population bestehend aus 18.000 M₂-Pflanzen, die von 1500 M₁-Pflanzen abstammten, wurden 4 unabhängige Mutationen identifiziert, die eine Verstärkung des Verzweigungsphänotyps von *las-4* bewirken. Sie wurden *enhancer of las-4* (*eol*) benannt. Sie sind dadurch charakterisiert, dass in *eol/las-4*-Doppelmutanten bei Anzucht unter Kurztagbedingungen die Seitentriebbildung in den Achseln der meisten Stängelblätter unterdrückt ist. In SEM-Aufnahmen der Blattachseln von *eol3/las-4* und *eol6/las-4* konnten keine meristemähnlichen Strukturen entdeckt werden.

Bei den 4 Linien handelt es sich vermutlich um Mutationen in verschiedenen Genen, dies konnte durch einen Allelie Test gezeigt werden. Es kann keine Aussage getroffen werden, ob *eol3* allelisch ist zu *eol6*, da diese Kreuzung nicht erfolgreich war.

Die Verstärkung des *las-4*-Verzweigungs-Phänotyps war bei den gefundenen *eol*-Linien unterschiedlich ausgeprägt. Neben Linien, die nahezu keine Seitentriebe in Stängelblättern anlegten (*eol3*, *eol5*) gab es auch zwei Linien, die einen schwächeren Phänotyp hatten (*eol1*, *eol6*). In diesen Linien wurden Seitentriebe ausschließlich in den Achseln der obersten Rosettenblätter angelegt.

Für *eol3*, *eol5* und *eol6* konnte ohne *las-4*-Hintergrund kein Phänotyp festgestellt werden. In Reis wurde ebenfalls eine Verstärkung des Verzweigungsphänotyps der *lax panicle* (*lax*) Mutante durch *small panicle* (*spa*) gefunden (Komatsu et al., 2003).

Bei den *EOL*-Loci könnte es sich um Gene handeln, die eine zu *LAS* redundante Funktion ausüben. Außerdem wäre es möglich, dass sie in Achseln von Stängelblättern Teil eines zu *LAS* redundanten Stoffwechselweges sind.

Die Tatsache, dass beim Durchsuchen relativ weniger unabhängiger Linien (1500 M₁-Linien) bereits vier unterschiedliche *eol*-Mutanten identifiziert wurden, legt die Vermutung nahe, dass die *EOL*-Gene Teil eines redundanten Signaltransduktinsweges sind.

Da bei den drei getesteten *eol*-Linien keine Phänotypen ohne *las-4*-Hintergrund sichtbar sind, wären sie in einem Mutagenese-Experiment mit Wildtyp-Pflanzen nicht entdeckt worden. Dies demonstriert den Vorteil einer Suche nach Modifikatoren.

Als Kandidaten scheiden deshalb auch Gene aus, die bereits als Einzelmutante einen ausgeprägten Verzweigungsphänotyp haben. Dies umfasst *REV*, *PINHEAD* (*PNH*) und *CARPEL FACTORY* (*CAF*). Mutationen in den drei genannten Genen zeigen zusätzlich zu den Verzweigungsphänotypen noch starke Defekte in der Infloreszenz (Talbert et al., 1995; McConnell und Barton, 1995; Jacobsen et al., 1999; Lynn et al., 1999; Otsuga et al., 2001; Park et al., 2002). In den Infloreszenzen der *eol/las-4*-Pflanzen waren dagegen keine oder nur schwache Phänotypen beobachtet worden.

Interessanterweise wurde eine Abhängigkeit des Verzweigungsphänotyps von den Lichtbedingungen bei der Anzucht festgestellt. *eol3/las-4*, *eol5/las-4* und *eol6/las-4* zeigten den Verzweigungsphänotyp erst nach einer Wachstumsphase von mehreren Wochen unter Kurztagbedingungen. Beispielsweise konnten *eol5/las-4*-Mutanten mit einem Seitentrieb nur dann gefunden werden, wenn die Pflanzen mindestens 4-5 Wochen im Kurztag kultiviert wurden. *eol1/las-4*-Pflanzen zeigten zwar auch unter Langtagbedingungen einen Phänotyp, waren aber spätblühend. Im ebenfalls spätblühenden Ökotyp Zürich konnte die

Unterdrückung von Lateralmeristemen festgestellt werden (Kalinina et al., 2002). Durch eine lange Vernalisationsphase kann der Blühzeitpunkts-Phänotyp unterdrückt werden. Interessanterweise wird dabei der Verzweigungsphänotyp auch unterdrückt.

Es ist also möglich, dass ein zu den *EOL*-Loci redundanter Stoffwechselweg durch die tageslichtabhängige Blühinduktion aktiviert wird. In *Arabidopsis* wird die Blühinduktion durch Lichtphasen von 16h induziert. Unter Kurztagbedingungen (8h) wird die Blühinduktion durch redundante Stoffwechselwege eingeleitet.

Ein weiterer wichtiger Aspekt wird durch den Vergleich mit der *lfy-14/las-4*-Doppelmutante deutlich. Dort konnte auch eine Ausweitung des *las-4*-Phänotyps auf Stängelblätter beobachtet, allerdings wurde das auf die geänderte Meristemidentität zurückgeführt. Da dies bei den *eol*-Phänotypen nicht der Fall ist, kann durch eine Identifizierung der korrespondierenden Gene vermutlich ein Beitrag zum besseren Verständnis der Sprossverzweigung in Achseln von Stängelblättern geleistet werden.

4.1.9 Wachstumsbedingungen und der genetische Hintergrund beeinflussen das Verzweigungsmuster von *las-4*-Mutanten

Als Kontrollexperiment wurden zusätzlich *las-4*-Einzelmutanten unter Kurztagbedingungen angezogen. Bei diesen Pflanzen blieben bei einem Teil der Pflanzen die untersten Stängelblätter ohne Trieb.

Ein wesentlich stärkerer Effekt wurde festgestellt, wenn sich *las-4* in einem *Ler*-Hintergrund befindet. Die Pflanzen bildeten durchschnittlich nur aus 60 % der Blattachseln von Stängelblättern Triebe. Eine Erklärung dafür kann die starke Apikaldominanz sein, die durch die *erecta*-Mutation ausgelöst wird (Torii et al., 1996). Durch die stärkere Apikaldominanz verzögert sich das Auswachsen der Lateralmeristeme. Wie bereits erwähnt, wurde bisher nur ein Einfluss von Apikaldominanz auf das Auswachsen von Achselknospen nachgewiesen (Cline, 1997; Napoli et al., 1999). Die Analyse der *axr1-12/las-4* Doppelmutante deutet aber auf eine Funktion von Auxin auf Anlage und Auswachsen von Achselmeristemen hin.

Wenn *LAS* an dieser Stelle dafür gebraucht wird, um die Zellgruppe an der adaxialen Blattbasis der Stängelblätter während einer Ruhephase in einem meristematischen Zustand zu halten, könnte sich dies im Hintergrund der *erecta* Mutation stärker auswirken.

Allerdings macht die Auswertung von *las-4* in den verschiedenen Ökotyp-Hintergründen und die Auswertung der F₂-Generation der Kreuzung *ag-1* mit *las-4* ein Zusammenwirken

mehrerer Loci wahrscheinlich. So könnten verschiedene Loci die Verteilung von Phytohormonen beeinflussen, die wiederum den *las-4*-Phänotyp beeinflussen. Außerdem wurden bei der Kartierung von *EOL3* auf Chromosom 2 und 5 wahrscheinlich QTL's, die das Verzweigungsmuster von *las-4* beeinflussen, festgestellt. In weiteren Experimenten kann diese Variabilität zwischen Ökotypen dazu verwendet werden, neue Loci zu identifizieren, die bei der Anlage von Lateralmeristemen beteiligt sind.

4.1.10 Die *eol3*-Mutation befindet sich auf Chromosom 1 und ist mit *las-4* gekoppelt

In dem Kartierungsexperiment konnte für *EOL3* eine Kartenposition ermittelt werden. Es liegt eine Kopplung von *EOL3* und *LAS* auf Chromosom 1 vor. Beide Loci liegen ca. 40 cM auseinander. Einerseits zeigte der Marker nga280 (81 cM) Cosegregation mit *las-4*, andererseits zeigte der Marker ciw12 (39 cM) ebenfalls kein Rekombinationsereignis.

Der Marker ciw12 wurde in einer Kontrollpopulation getestet. Aus der F₂-Generation einer Kreuzung von *ag-1* und *las-4* wurden Pflanzen mit *las-4*-Phänotyp ausgewählt. Da sich *ag-1* in einem *Ler*-Hintergrund befindet und *las-4* in einem Columbia-Hintergrund kann anhand der ausgewählten Pflanzen getestet werden, wie *Ler* und *Col* Chromosomen ohne *eol3* im Hintergrund verteilt. Die genannten Pflanzen wurden mit dem Marker ciw12 getestet und zeigten 31 % *Ler*-Chromosomen. Erwartet wurden 40%, da die genetische Distanz zwischen ciw12 und *LAS* etwa 40 cM beträgt. Trotzdem ist ein deutlicher Unterschied zu der Segregation der *Ler* Chromosomen bei ciw12 getesteten *eol3/las-4*-Pflanzen zu erkennen.

Außerdem wurden weitere Marker getestet, die zwischen nga280 und ciw12 kartieren. Mehrere *eol3/las-4*-Pflanzen zeigten Rekombinationsereignisse, die vermutlich durch Doppelrekombination erzeugt wurden. Dies demonstriert, dass es sich um zwei unterschiedliche Loci handelt und *eol3* mit dem Marker ciw12 cosegregiert.

Weitere Marker wurden verwendet. Die Marker ciw12 und nga392 liegen bei 9,6 bzw. 9,8 Mb und zeigen Cosegregation. Sie sind flankiert von den Markern ZFBP (8,7 Mb) und SO 392 (10,8 Mb), die jeweils eine rekombinante Pflanze aufdecken. *EOL3* muss also zwischen ZFBP und SO392 liegen. Dieser Bereich umfasst 2,1 Mb und mehrere hundert Gene sind dort kodiert. Deshalb macht ein Kandidaten-Gen Ansatz noch keinen Sinn. Es muss in einer größeren Population ein Fein-Kartierungs-Ansatz durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der genetischen Charakterisierung des Gens *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)* aus *Arabidopsis thaliana* und der Identifizierung neuer, an dem Prozess der Initiation von Lateralmeristemen beteiligter Gene. Der *las-4*-Mutante liegt eine 20 bp-Deletion im ersten Drittel des *LAS*-Gens zugrunde, die zu einer Unterdrückung der Anlage von Lateralmeristemen in den Achseln der Rosettenblätter führt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die *las-4*-Mutante mit anderen Mutanten, die spezifische Entwicklungsdefekte zeigen, gekreuzt, um die Rolle von *LAS* bei der Initiation von Lateralmeristemen zu untersuchen. Eine Gruppe von Mutanten zeichnet sich durch ein verstärktes Auswachsen der Achseltriebe aus der Blattrosette aus. Die Analyse der *axr1-12/las-4*-, *max1-1/las-4*- und *max2-1/las-4*-Doppelmutanten zeigte in allen drei Fällen eine Unterdrückung der Seitensprossentwicklung aus den Achseln der Rosettenblätter. Somit wirkt *las-4* in diesem Entwicklungsprozess epistatisch über *axr1-12*, *max1-1* und *max2-1*. In der *axr1-12/las-4*-Doppelmutante wurde außerdem festgestellt, dass im Vergleich zur *las-4* Mutante eine größere Anzahl der jüngeren Rosettenblätter Seitentriebe anlegt. Da in *axr1-12*-Mutanten verschiedene Mechanismen der Signaltransduktion des Phytohormons Auxin gestört sind, lässt dieses Ergebnis auf eine Rolle von Auxin sowohl bei der Initiation von Achselmeristemen als auch beim Auswachsen der Achselknospen schließen.

Außerdem konnte im Rahmen der vorliegenden Studie eine Beteiligung von *LAS* bei der Initiation von Lateralmeristemen während der reproduktiven Phase nachgewiesen werden. So ist die Bildung akzessorischer Seitentriebe aus Stängelblättern von *axr1-12/las-4*-Doppelmutanten unterdrückt, ebenso unterdrückt *las-4* bei der homöotischen Blüten-Mutante *ap1-10* die Bildung ektopischer Blüten. Des Weiteren zeigten *stm-2/las-4*- und *wus-1/las-4*-Doppelmutanten synergistische Effekte in der Infloreszenz, was auf redundante Funktionen von *LAS* mit *STM* bzw. *WUS* bei der Entwicklung von Infloreszenzen hinweist. Außerdem deckte die Analyse von *stm-2/las-4*- und *wus-1/las-4*-Pflanzen eine gemeinsame Funktion bei der Trennung von Organen auf, da in beiden Fällen ausgeprägte Fusionen von Blattstielen festgestellt wurden.

Das *REVOLUTA*-Gen ist wie *LAS* für die Anlage von Achselmeristemen nötig. Da in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, dass *rev* die frühe postembryonale Organogenese von *wus-1* und *stm-2* teilweise unterdrückt, wurden *wus-1/las-4* und *stm-2/las-4*-Pflanzen etabliert und charakterisiert. Die Analyse zeigte, dass *las-4* die postembryonale Organogenese von *stm-2* und *wus-1* im Gegensatz zu *rev* nicht unterdrückt. Die Charakterisierung von *rev*-

5/*las-4*-Doppelmutanten zeigte ausserdem, dass *las-4* die Seitentriebe aus der Rosette, die *rev-5* aufgrund seiner Variabilität des Phänotyps bildet, unterdrückt. Zusammen deutet dies darauf hin, dass beide Gene nicht im gleichen Signaltransduktionsweg fungieren.

In einem zusätzlichen Experiment wurde ein Einfluss der Meristemidentität auf das Verzweigungsmuster von *las-4*-Mutanten untersucht. In *las-4*-Mutanten ist die Anlage von Lateralmeristemen in Achseln der vegetativen Rosettenblätter unterdrückt, nicht aber in den Achseln der Stängelblätter. Weil in *lfy-14*-Mutanten das SAM auch nach der Blühinduktion vegetativen Charakter behält, wurde die Mutation mit *las-4* kombiniert. Zog man die Doppelmutanten unter Kurztagbedingungen an, war im Gegensatz zu *las-4*- und *lfy-14*-Einzelmutanten die Seitentriebbildung aus Achseln von Stängelblättern nahezu völlig unterdrückt. Daraus kann geschlossen werden, dass in *las-4*-Mutanten ein Impuls vom Infloreszenzmeristem zur Anlage von Achseltrieben aus Stängelblättern notwendig ist. In einem zweiten Ansatz wurde die *las-4*-Mutante chemisch mutagenisiert und unter den Nachkommen Mutanten identifiziert, die im Gegensatz zu *las-4* keine Seitentriebe in Achseln von Stängelblättern anlegen. Es wurden 4 unabhängige, nicht allelische Linien, die *enhancer of las-4* (*eol*) benannt wurden, genauer charakterisiert. Bei *eol3/las-4*-, *eol5/las-4*- und *eol6/las-4*-Pflanzen war die Anlage der Achselmeristeme aus Stängelblätter nur bei Anzucht unter Kurztagbedingungen unterdrückt, nicht aber unter Langtagbedingungen. *eol1/las-4*-Mutanten zeigten auch unter Langtagbedingungen eine reduzierte Verzweigung, waren aber spätblühend. Um einen der betroffenen Loci zu identifizieren, wurde zum Abschluss für *eol3/las-4* eine Kartierung mit auf der PCR-Technik basierenden Markern durchgeführt. Die ermittelte Position befindet sich eng gekoppelt mit den Markern *ciw12* und *nga392* auf Chromosom1 und zeigt deshalb ebenfalls Kopplung mit dem *LAS*-Locus.

6 Abstract

This study deals with the genetic characterisation of the *LAS*-gene of *Arabidopsis thaliana* and the identification of currently unknown loci involved in the process of lateral meristem initiation. The *las-4* mutation, a 20 bp deletion towards the beginning of the *LAS* open reading frame, results in a suppression of lateral meristem initiation in axils of rosette leaves. The formation of side shoots from the axils of cauline leaves is not affected. In order to study the role of *LAS* in the process of lateral meristem initiation, the *las-4* mutation was combined with other mutations that lead to specific developmental defects. A set of mutants is characterised by an enhanced outgrowth of lateral shoots from the rosette. Detailed analysis of *axr1-12/las-4*, *max1-1/las-4* and *max2-1/las-4* double mutants revealed a suppression of lateral meristem development from the axils of rosette leaves. This indicates that *las-4* acts epistatic to *axr1-12*, *max1-1* and *max2-1* with respect to this process. Interestingly, in contrast to *las-4* single mutants, in *axr1-12/las-4* plants, the formation of lateral shoots was observed in a larger fraction from the oldest rosette leaves. As multiple aspects of auxin signalling are affected in *axr1-12*, this result suggests a role of auxin in the processes of both initiation and outgrowth of lateral shoots. Additionally, the suppression of the initiation of accessory shoots from axils of cauline leaves in *axr1-12/las-4* plants indicates a role of *LAS* during reproductive development. This is supported by the observed suppression of ectopic flower formation from pedicels/peduncles in *ap1-10/las-4* mutants. A redundant function of *LAS* with *STM* and *WUS* during development of inflorescences could also be concluded from the finding that both *stm-2/las-4* and *wus-1/las-4* mutants show synergistic effects in their inflorescences. The observation of severe fusions of petioles in both double mutants suggests an overlapping function of *LAS* with *STM* and *WUS* in organ separation. Like *LAS*, the *REVOLUTA* gene has been shown to be necessary for the initiation of lateral meristems. *las-4* suppresses the variability of the *rev-5* branching phenotype from the rosette. Taken together with the finding that *las-4*, in contrast to *rev*, does not suppress early postembryonic organogenesis in *stm-2* and *wus-1* mutants, this indicates that both genes act in separate developmental pathways. Because *las-4* mutants fail to develop axillary meristems from axils of rosette leaves, but not from cauline leaves, the influence of meristem identity on the *las-4* branching phenotype was analysed. A *lfy-14/las-4* double mutant was established since the SAM of *lfy-14* mutants maintains vegetative character even after floral induction. When grown under short day conditions, in these double mutants, the initiation of axillary meristems from cauline leaves

was suppressed. This suggests an important influence of the reproductive meristem in axils of cauline leaves in *las-4* mutants. In a second approach *las-4* mutants were mutagenised and the progeny were screened for mutants with an enhanced branching phenotype compared to *las-4*. Four independent, non allelic *enhancer of las-4* (*eol*) lines were characterised in detail. In *eol3/las-4*, *eol5/las-4* and *eol6/las-4* the initiation of lateral shoots from cauline leaves was suppressed only when the plants were grown under short day conditions. *eol1/las-4* plants showed reduced branching under both long- and short day conditions and were late flowering. In a PCR based approach, the map position of *EOL3* was determined. *EOL3* is located on chromosome1, closely linked to markers *ciw12* and *nga 392* and is also linked to *LAS*.

7 Literaturverzeichnis

- Barton, M K und Poethig, RS** (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wildtype and *SHOOT MERISTEMLESS* mutant. *Development* **119**, 823-831.
- Bolle C** (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**: 683-692
- Bowman, J L, Smyth, D R und Meyerowitz, E M** (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1**, 37-52.
- Brand, U, Fletcher, J C, Hobe, M, Meyerowitz, E M und Simon, R** (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**, 617-619.
- Brand, U, Grünewald, M, Hobe, M und Simon, R** (2002). Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**, 565-75.
- Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA** (2000) Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**(6815): 967-971.
- Clark S E, Running M P, Meyerowitz E M** (1993) *CLAVATA1*, a negative regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* **119**: 397-418
- Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM** (1995). *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* **121**:2057-2067.
- Clark, S E, Jacobsen, S E, Levin, J Z und Meyerowitz, E M** (1996). The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 1567-75.
- Clark, S E, Williams, R W und Meyerowitz, E M** (1997). The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-85.
- Cline, MG** (1997). Concepts and terminology of apical dominance. *Amer. J. Bot.* **84**: 1064–1069.
- Coen, E S und Meyerowitz, E M** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-7.
- Del Pozo J C, Timpte C, Tan S, Callis J, Estelle M** (1998) The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science* **280**: 1760-1763

Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Fledmann KA, Benfey PN (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86**(3): 423-433.

Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and *KANADI* genes. *Curr Biol.* **13**(20):1768-74.

Endrizzi, K, Moussian, B, Haecker, A, Levin, JZ und Laux, T (1996). The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J.* **10**, 101–113.

Estelle M, Somerville C (1987) Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Mol Gen Genet* **206**: 200-206

Fletcher, J C, Brand, U, Running, M P, Simon, R and Meyerowitz, E M (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.

Grbic V, Bleecker AB (2000) Axillary meristem development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **21**(2): 215-223.

Greb T, Clarenz O, Schäfer E, Müller D, Herrero R, Schmitz G, Theres K (2003) Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes & Development* **17**: 1175-1187

Hay A, Kaur H, Phillips A, Hedden P, Hake S, Tsiantis M (2002) The Gibberellin pathway mediates *KNOTTED1*-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr Biol* **12**: 1557-1565.

Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser M, Benfey PN (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* **101**(5): 555-567.

Hempel FD, Feldman LJ (1994) Bi-directional inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*: Acropetal initiation of flowers and basipetal initiation of bracteoles. *Planta* **192**(2): 276-286.

Huala E, Dickerman AW, Garcia-Hernandez M, Weems D, Reiser L, LaFond F, Hanley D, Kiphart D, Zhuang M, Huang W, Mueller LA, Bhattacharyya D, Bhaya D, Sobral BW, Beavis W, Meinke DW, Town CD, Somerville C, Rhee SY (2001) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res* **29**(1): 102-105.

Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M (2002) The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of *SLENDER RICE1* in Nuclei. *Plant Cell* **14**: 57-70.

- Jacobsen SE, Running MP, Meyerowitz EM** (1999) Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* **126**(23): 5231-5243.
- Jeong, S, Trotochaud, A E und Clark, S E** (1999). The *Arabidopsis* *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-34.
- Kalinina A, Mihajlovic N, Grbic V** (2002) Axillary meristem development in the branchless *Zu-0* ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**: 699-707
- Kayes JM, Clark SE** (1998). *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development* **125**:3843-3851
- Komatsu K, Maekawa M, Ujiie S, Satake Y, Furutani I, Okamoto H, Shimamoto K, Kyojuka J** (2003) *LAX* and *SPA*: Major regulators of shoot branching in rice *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(20): 11765-11770
- Lammer D, Mathias N, Laplaza J M, Jiang W, Liu Y, Callis J, Goebel M, Estelle M** (1998) Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes &Development* **12**: 914-926
- Laux, T, Mayer, K F, Berger, J und Jurgens, G** (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 87-96.
- Lenhard, M, Bohnert, A, Juergens, G und Laux, T** (2001). Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* **105**, 805–814.
- Leyser O, Lincoln C A, Timpote C, Lammer D, Turner J, Estelle M** (1993) *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **364**: 161-164
- Li X, Qian Q, Fu Z, Wang Y, Xiong G, Zeng D, Wang X, Liu X, Teng S, Hiroshi F, Yuang M, Luo D, Han B, Li J** (2003) Control of tillering in rice. *Nature* **422**: 618-621
- Lincoln C, Britton J H, Estelle M** (1990) Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 1071-1080
- Liljegren, SJ, Gustafson-Brown, C, Pinyopich, A, Ditta, GS und Yanofsky, MF** (1999). Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *Plant Cell* **11**, 1007–1018.
- Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC** (2002) Endogenous and Silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* **14**: 1605-1619.
- Lohmann, J U, Hong, R L, Hobe, M, Busch, M A, Parcy, F, Simon, R und Weigel, D** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **105**, 793-803.

- Long, J A, Moan, E I, Medford, J I und Barton, M K** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-9.
- Lukowitz W, Gillmor C S, Scheible WR** (2000) Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels so good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiology* **123**: 795-805
- Lyndon RF** (1990) Plant Development. (Topics in plant physiology; 3) Unwin Hyman, London.
- Lynn K, Fernandez A, Aida M, Sedbrook J, Tasaka M, Masson P, Barton MK** (1999) The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE1* gene. *Development* **126**: 469-481.
- Mandel MA, Gustafson-Brown C, Savidge B, Yanofsky MF** (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* **360**(6401):273-7.
- Mayer, K F, Schoof, H, Haecker, A, Lenhard, M, Jurgens, G und Laux, T** (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805-15.
- McConnell JR, Barton MK** (1995) Effect of mutations in the *PINHEAD* gene of *Arabidopsis* on the formation of shoot apical Meristem. *Dev Genet* **16**: 358-366.
- Morimoto M, Nishida T, Honda R, Yasuda H** (2000) Modification of cullin-1 by ubiquitin-like protein Nedd8 enhances the activity of SCF(skp2) toward p27(kip1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**: 1093-1096
- Morohashi K, Masayoshi M, Hisabumi T, Yasuo H, Kazuyuki H** (2003) Isolation and characterization of a novel GRAS gene that regulates meiosis-associated gene expression. *J Biol Chem* **278**: 20865-20873
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN** (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413**(6853): 307-311.
- Napoli, CA, Beveridge, CA, and Snowden, KC** (1999). Reevaluation concepts of apical dominance and the control of axillary bud outgrowth. *Curr. Top. Dev. Biol.* **4**: 127-169
- Otsuga D, DeGuzman B, Prigge MJ, Drews GN, Clark SE** (2001) *REVOLUTA* regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J* **25**: 223-236.
- Ori N, Eshed Y, Chuck G, Bowman JL, Hake S** (2000) Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* **127**: 5523-5532
- Parcy, F, Nilsson, O, Busch, M A, Lee, I und Weigel, D** (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**, 561-6.
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X** (2002). *CARPEL FACTORY*, a Dicer homolog, and *HEN1*, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol.* **12**(17):1484-95

Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP (1997) The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**(23): 3194-3205.

Putterill J, Laurie R, Macknight R (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *BioEssays* **26**(4):363-73

Reintanz B, Lehnert M, Reichelt M, Gershenzon J, Kowalczyk M, Sandberg G, Godde M, Uhl R, Palme K (2001) bus, a bushy *Arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* **13**(2): 351-367.

Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, Burge C B, Bartel B, Bartel D P (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell*: **110**: 513-520

Rojo, E, Sharma, VK, Kovaleva, V, Raikhel, NV und Fletcher, JC (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**, 969–977.

Rossberg M, Theres K, Acarkan A, Herrero R, Schmitt T, Schumacher K, Schmitz G, Schmidt R (2001) Comparative sequence analysis reveals extensive microlinearity in the *Lateral Suppressor* Regions of the tomato, *Arabidopsis*, and *Capsella* Genomes. *Plant Cell* **13**: 979-988.

Sakamoto T, Kamiya N, Ueguchi-Tanaka M, Iwahori S, Matsuoka M (2001) KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes & Development* **15**: 581-590

Samach, A, Klenz, JE, Kohalmi, SE, Risseuw, E, Haughn, GW und Crosby, WL (1999). The UNUSUAL FLORAL ORGANS gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *Plant J.* **20**, 433–445.

Silverstone AL, Jung H, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun T (2001) Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the *RGA* protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**(7): 1555-1565.

Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T (1998) The *Arabidopsis* *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**(2): 155-169.

Schoof, H, Lenhard, M, Haecker, A, Mayer, K F, Jurgens, G und Laux, T (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**, 635-44.

Steeves, TA und Sussex, IM (1989). Patterns in Plant Development. (New York: Cambridge University Press), 895-905.

Schmitz G, Tillmann E, Carriero F, Fiore C, Cellini F, Theres K (2002) The tomato *Blind* gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation on lateral Meristems. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(2): 1064-1069.

Schumacher K, Schmitt T, Rossberg M, Schmitz G, Theres K (1999) The *Lateral suppressor (Ls)* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc Natl Acad Scie USA* **96**: 290-295.

Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HM (2002) *MAX1* and *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* **129**(5):1131-41.

Stirnberg P, Chatfield SP, Leyser HMO (1999) *AXR1* acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **121**(3): 839-847.

Stuurman J, Jäggi F, Kuhlemeier C (2002) Shoot meristem maintenance is controlled by a *GRAS*-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes Dev* **16**: 2213-2218.

Sussex IM, Kerk NM (2001) The evolution of plant architecture. *Curr Opinion in Plant Biology* **4**: 33-37.

Talbert PB, Adler HT, Paris DW, Comai L (1995) The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**(9): 2723-2735.

Tantikanjana T, Yong JWH, Letham DS, Griffith M, Hussain M, Ljung K, Sandberg G, Sundaresan V (2001) Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the *SUPERSHOOT* gene. *Genes Dev* **15**: 1577-1588.

Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF, Komeda Y (1996). The *Arabidopsis ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **8**(4):735-46.

Weigel, D, Alvarez, J, Smyth, D R, Yanofsky, M F und Meyerowitz, EM (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**, 843-859.

Weigel, D und Nilsson, O (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**, 495-500.

Woo H R, Chung K M, Park J H, Oh S A, Ahn T, Hong S H, Jang S K, Nam H G (2001) *ORE9*, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1779-1790

Xu, L, Liu, F, Lechner, E, Genschik, P, Crosby, WL, Ma, H, Peng, W, Huang, D und Xie, D (2002). The SCFCO11 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 1919-1935

Yanofsky, M F, Ma, H, Bowman, J L, Drews, G N, Feldmann, K A und Meyerowitz, E M (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* **346**, 35-9.

Yu H, Ito T, Wellmer F, Meyerowitz E M (2004). Repression of *AGAMOUS-LIKE24* is a crucial step in promoting flower development. *Nature genetics* **36**(2):157-61.

Zhong R, Ye ZH (1999) IFL1, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell* **11**(11): 2139-2152.

8 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Klaus Theres betreut worden.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Greb T, Clarenz O, Schäfer E, Müller D, Herrero R, Schmitz G, Theres K (2003)
Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes & Development* **17**: 1175-1187

Köln, den 24.5.2004

9 Lebenslauf

Oliver Clarenz
Nußbaumerstr.74
D-50823 Köln
Tel: 0221/1306848
Email: clarenz@mpiz-koeln.mpg.de

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum:	04.08.1972
Geburtsort:	Leverkusen
Eltern:	Dr. Heinz Werner Clarenz, Diplom-Chemiker Friderike Waltraud Barbara Clarenz, geb. Winkler, Oberstudienrätin
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Religion:	evangelisch

Schul und Hochschulbildung:

1979-1983	Gemeinschaftsgrundschule Fontanestrasse, Leverkusen
1983-1992	Lise-Meitner-Schule, Leverkusen, Abitur
1992-1993	Wehrersatzdienst beim Lazarus-Hilfsdienst, Leverkusen
1994-1996	Grundstudium der Biologie, Universität zu Mainz
1996-2000	Hauptstudium der Biologie, Universität zu Köln, Diplom
2000-heute	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln

Danksagung:

Prof. Dr. Klaus Theres für die Betreuung dieser Arbeit und für hilfreiche Diskussionen

Prof. Maarten Koornneef für hilfreiche Diskussionen

Dr. Gregor Schmitz für hilfreiche Diskussionen während der Durchführung der Laborarbeit
und beim Anfertigen der Arbeit

Andrea Eicker, Dörte Müller, Smita Raman, Elisabeth Schäfer und Silke Schulze für Hilfe im
Labor und beim Anfertigen dieser Arbeit (und das Gefühl, mich wenigstens einmal im Leben
wie der Hahn im Korb zu fühlen)

Martin Hobe für wichtige Hilfe und Unterstützung beim Anfertigen der Arbeit

Thomas Wendl für Hilfe beim Anfertigen der Arbeit

Dem 1.FC Köln, weil er netterweise die letzten Jahre immer mindestens auf einem
zweistelligen Tabellenplatz oder in der zweiten Liga verbracht hat, was mir eine Menge
vermutlich völlig unsachlicher Diskussion über die Weltstadt Leverkusen erspart hat

Rose Club, LMH und Saturn...

Meiner lieben Familie und insbesondere meinen Eltern für die Unterstützung in den letzten
Jahren